

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE MONTPELLIER SUPAGRO

En mécanismes des Interactions parasitaires pathogènes et symbiotiques

École doctorale [GAIA – Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau]

Unités de recherche UMR ASTRE (CIRAD) – UMR Mycoplasmoses des Ruminants (ANSES)

**Le sécrétome des bactéries du genre *Mycoplasma* : focus
sur les protéases sécrétées et les vésicules extracellulaires
produites chez les mycoplasmes des ruminants.**

Présentée par Sarah GANTER

Le 21 novembre 2019

Sous la direction de François THIAUCOURT et Florence TARDY

Devant le jury composé de

Pr Joachim FREY, Professeur émérite, Université de Bern
Dr Fabienne ARCHER, Directrice de recherche, INRA, Lyon
Dr Isabelle KEMPF, Directrice de recherche, ANSES, Ploufragan
Dr Laure BEVEN, Maître de conférences, HDR, INRA, Bordeaux
Dr Monique ROYER, Chercheur, HDR, CIRAD, Montpellier
Dr François THIAUCOURT, Chercheur, HDR, CIRAD, Montpellier
Dr Florence TARDY, Chargée de recherche, HDR, ANSES, Lyon

Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse
Membre invité



**UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER**



Laboratoires d'accueil :

Cette thèse a été réalisée à l'UMR ASTRE (Animal, Santé ; Territoires, Risques, Ecosystèmes)
Au Centre International de Recherche en Agronomie pour le Développement (CIRAD)
Campus international de Baillarguet
34398 Montpellier Cedex

Ainsi qu'à l'UMR Mycoplasmoses des Ruminants
A l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES)
31, avenue Tony Garnier
69394 Lyon Cedex 07
France

Sous la direction de François Thiaucourt, Florence Tardy et Patrice Gaurivaud
Et l'encadrement de Lucia Manso-Silvan

Résumé :

Les bactéries du genre *Mycoplasma* (*M.*) sont responsables chez les ruminants de maladies majeures dont trois sont à déclaration obligatoire auprès de l'organisation mondiale de la santé animale. Malgré l'importance de ces bactéries, leurs facteurs de virulence restent mal caractérisés. Les molécules appartenant au sécrétome mycoplasmaïque sont des candidats privilégiés en tant que facteurs de virulence en raison de leur interaction potentielle avec les cellules de l'hôte. Le sécrétome regroupe les composés libérés dans le milieu extracellulaire, l'exosécrétome, et ceux présents à la surface membranaire, ainsi que la machinerie impliquée dans la sécrétion. Il a peu été étudié chez les mycoplasmes. Nos recherches se sont focalisées sur l'exosécrétome et, plus particulièrement, sur les protéases sécrétées et les vésicules extracellulaires pour des espèces de mycoplasmes couramment isolées chez les ruminants, notamment au niveau de la sphère respiratoire.

Une activité protéasique de type caséinolytique a été mise en évidence chez plusieurs espèces. Pour certaines, cette activité pourrait être extracellulaire car détectée dans le surnageant de culture ou diffuse en milieu gélosé. L'emploi d'un milieu défini, couplé à la zymographie et à la spectrométrie de masse, nous a permis d'observer que trois sous-espèces appartenant au « groupe *mycoides* » et pathogènes sécrètent des protéases actives. L'étude d'un mutant de *M. capricolum* subsp. *capricolum*, California Kid dont le gène MCAP_0240 codant pour une protéase S41 a été inactivé, a confirmé que l'activité caséinolytique était portée par cette protéase. De plus, chez ce mutant la sécrétion dans le milieu extérieur de 17 protéines a été modifiée. Cette peptidase pourrait donc intervenir dans le clivage post traductionnel de protéines de surface et donc intervenir dans les mécanismes de sécrétion.

Dans un second temps nous nous sommes intéressés à un autre élément de l'exosécrétome, les vésicules extracellulaires, produites par plusieurs espèces de mycoplasmes en condition de stress nutritionnel. L'étude du protéome membranaire des vésicules nous a permis de mettre en évidence de nombreuses protéines dont la capacité d'interaction avec l'hôte est décrite dans la littérature. Sur une sous-espèce modèle produisant de nombreuses vésicules, *M. mycoides* subsp. *mycoides*, nous avons montré que cette production résultait d'un phénomène actif nécessitant une viabilité cellulaire et avons observé par microscopie électronique la formation de vésicules par bourgeonnement. Dans nos conditions expérimentales, les vésicules extracellulaires sont produites en phase de déclin. Nous nous sommes donc intéressés plus particulièrement à cette phase et à ce qui pourrait favoriser la production de vésicules. Plusieurs conditions expérimentales visant à optimiser la purification des vésicules ont également été testées, l'objectif final étant de pouvoir soumettre les vésicules extracellulaires à une analyse par spectrométrie de masse et ainsi caractériser l'ensemble des protéines présentes.

En conclusion, ces travaux ont permis de détecter dans le milieu extracellulaire de cultures mycoplasmaïques des protéases actives et des vésicules extracellulaires portant à leur membrane diverses protéines en interaction potentielle avec l'hôte animal. Le rôle de ces deux éléments comme systèmes de sécrétion et/ou facteurs de virulence potentiels devra faire l'objet de futures investigations.

Mots clés : *Mycoplasmes* / Sécrétome / Protéase / Vésicules

Abstract:

Bacteria belonging to the *Mycoplasma* (*M.*) genus are responsible for major diseases in ruminants, three of which are notifiable to the world organization for animal health. Despite this, their virulence factors are still poorly characterized. Molecules belonging to the mycoplasma secretome are potential candidates as virulence factors, as they are likely to interact with the host cells. The secretome includes compounds released in the extracellular compartment, also called the exosecretome, compounds exposed to the surface and the secretion machinery itself. The secretome has been poorly studied in mycoplasmas so far. Our research focused on the exosecretome and more specifically on secreted proteases and extracellular vesicles from *Mycoplasma* species commonly isolated in ruminant respiratory tract.

A proteasic, caseinolytic activity was identified for several *Mycoplasma* species. For some of them, this activity was hypothesized to be present in the extracellular compartment as it was detected in the culture supernatant of after diffusion on milk agar plate. The use of a defined medium linked with mass spectrometry allowed us to observe that three pathogenic sub-species belonging to the *Mycoides* cluster were able to secrete active extracellular proteases. A mutant strain of *M. capricolum* subsp. *capricolum* California Kid for which the gene MCAP_0240 (encoding an S41 protease) was inactivated was used to confirm that the extracellular caseinolytic activity was abolished in the absence of the S41 protease. In the mutant strain, the secretion of 17 other proteins was also shown to be modified. Hence, the S41 protease could play a role in post translational cleavage of surface proteins and, thus in secretion mechanisms.

In a second phase, we studied another element of the exosecretome, the extracellular vesicles, which are produced by several *Mycoplasma* species in nutritional stress conditions. Analyses of membrane proteins of the vesicles highlighted several proteins known to be in interaction with the host cells, as described in the literature. *M. mycoides* subsp. *mycoides*, was subsequently chosen as a model sub-species due to its high production of vesicles. It was used to show that vesicles release relies on cell viability and that vesicles are formed by a budding-type mechanisms as observed by electronic microscopy. In our experimental conditions, the vesicles were released in the decline growth phase. In consequence, we tried to identify which conditions of this growth phase were promoting the vesicles production. Several assays for optimizing vesicles purification were also tested *in vitro*, the ultimate goal being to be able to better characterize the whole extracellular vesicle proteins content by mass spectrometry.

In conclusion, this work allowed us to detect secreted proteases and extracellular vesicles, carrying several membrane proteins, which could interact with the animal host. The role of these two elements as secretion systems and/or virulence factors has yet to be further studied.

Keywords : *Mycoplasma* / Secretome / Protease / Vesicles

A Jeanne et Gérard

Remerciements:

Je remercie en premier lieu la directrice de l'unité ASTRE du CIRAD de Montpellier, Mme Vachier ainsi que le directeur du laboratoire de Lyon de l'ANSES M. Lempereur pour m'avoir accueillie et ainsi me permettre de réaliser ce doctorat.

Je tiens également à remercier les docteurs Fabienne Archer et Isabelle Kempf pour avoir accepté d'étudier et de juger ce travail de thèse en tant que rapporteurs. Je remercie l'ensemble des membres du jury, les docteurs Monique Royer, Laure Beven et le professeur Joachim Frey pour avoir accepté l'examen de mon travail.

Mes très sincères remerciements sont adressés à mes directeurs de thèse Florence Tardy, François Thiaucourt et Patrice Gaurivaud ainsi qu'à ma co-encadrante Lucia Manso-silvan pour l'encadrement dont j'ai bénéficié. J'ai apprécié, leurs disponibilités, leurs soutiens durant ces 3 années et tout particulièrement leurs aides quant à l'organisation et la rédaction de ce manuscrit.

Je remercie aussi Mme Destoumieux-Garzon, Mme Beven, M. Desvaux et M. Holzmüller pour l'apport de leurs conseils et pour avoir accepté de participer à mes comités de suivi de thèse.

Je voudrais remercier l'ensemble des personnes que j'ai eu la chance de côtoyer tant au laboratoire de Lyon qu'au laboratoire de Baillarguet, je garde le souvenir d'échanges fructueux.

Je remercie plus particulièrement les membres de l'UMR mycoplasmoses des ruminants, Florence, Patrice, Agnès, Adélie, Maryne, Chloé, Véronique, Claire et tous les collègues de VetAgro Sup ainsi que Victoria, Alexandre, Laurianne, Anthéa, Angélique, Miranda et Juan pour tous les moments partagés, laissant défiler ces 3 années à une vitesse incroyable.

Je remercie au même titre toute l'« équipe » mycoplasmes de l'UMR ASTRE, François, Lucia, Armelle, Philippe, Valérie ainsi que Tiffany et Olivia pour leur accueil et leur gentillesse. François je te suis reconnaissante pour tes nombreux conseils et le partage de cette passion des mycoplasmes. Lucia, j'ai apprécié ton écoute et tes conseils lors des différentes phases de rédaction.

Un grand merci à Florence et Patrice pour les nombreuses relectures de ce manuscrit, je mesure la chance qui m'a été donnée de vous avoir à mes côtés dans ma direction de thèse. Patrice, un immense merci pour ta patience, ta gentillesse, ton aide, ton soutien m'a été extrêmement précieux. Florence, comment ne pas te remercier pour ton accompagnement et toute la rigueur associée, j'ai ainsi progressé et réalisé mon travail dans de bonnes conditions.

Merci à mes nombreux collègues de bureau, Tiffany, Antoni, Miranda, Juan, Tiphany, Luana, Tony, Rodolphe, Raquel et Sofia pour avoir animé mes journées durant ces trois dernières années.

Merci également à l'équipe AVB du laboratoire de Lyon pour nos échanges formels et informels lors des pauses cafés.

Adélie, Antoni, Tiffany, Olivia, Lucile, Maxime et Rachid je vous remercie pour tous les bons moments passés ensemble que ce soit au laboratoire ou à l'extérieur !

Je souhaite remercier mes amis de la fac des sciences de Nancy pour leur accompagnement durant ces longues études (Anaïs, Marie M., Kathleen, Marie C., Floriane, Nicholas, Ludivine, Clémence, Robin, Florian, Pierre et Adrien).

Merci à mes anciens encadrants de stage, notamment pour leur incitation à continuer dans le milieu de la recherche, Benoit, Thierry, J-S, P-P et Patrick.

Un merci à la famille Pellegrini pour son encouragement et sa compréhension et tout particulièrement à Bernadette qui a non seulement donné de son temps pour relire tout mon travail mais m'a également fait partager son expérience.

Je tiens à remercier ma famille et tout spécialement mes merveilleux parents que j'aime tant, pour leur soutien qu'il soit moral ou financier durant ces nombreuses années d'études !! Sans vous, rien de tout cela ne serait possible.

Merci à la famille Freund pour votre soutien malgré la distance, j'espère pouvoir vous rendre visite plus souvent une fois ce doctorat terminé.

J'ai une pensée pour Noémie, mon petit rayon de soleil, qui a toujours les mots pour faire rire et dont je suis si fière. Merci.

À ma moitié qui partage mon quotidien depuis quelques années, mon JB, merci d'avoir consacré du temps pour m'épauler et surtout d'avoir supporté mes états d'âme durant ces 3 dernières années. De par ton soutien, tu as sans aucun doute une part très importante dans l'aboutissement de ce travail.

Table des matières

Résumé	5
Abstract	7
Remerciements.....	11
Abbréviations	15
Liste des figures	17
Liste des Tableaux	19
Partie I : Introduction générale	23
1. Les mycoplasmes	23
2. Les mycoplasmes des ruminants et les pathologies associées	31
3. Concepts actuels de la virulence des mycoplasmes.....	44
3.1. Adhésion	47
3.2. Interaction avec le système immunitaire: immunomodulation et échappement	55
3.3. Le pouvoir cytotoxique	66
4. Le sécrétome des mycoplasmes	70
5. Contexte et objectifs de l'étude	79
Partie II : La recherche d'activité protéasique extracellulaire.....	85
1. Contexte et stratégie de recherche	85
2. Abstract	88
3. Importance	89
4. Introduction	89
5. Materials and methods	91
6. Results	96
6.1. Protease activity of mollicutes found in ruminant lungs.....	96
6.2. Assessment of extracellular proteolytic activity.	98
6.3. Extracellular caseinolytic activity in defined medium.....	100
6.4. Identification of genes potentially coding for proteases in Mmc and Mycoplasma bovirhinis species and tandem mass spectrometry analysis.	100
6.5. Proteases located preferentially in the supernatant.	103
6.6. Identification of caseinolytic proteases by zymography.	104
6.7. Assessment of the extracellular protease activity of predicted S41 peptidases by analysis of mutant strains.	107
6.8. In silico analysis of serine protease CBW53985.1 (MLC_2570).	108
7. Discussion	110
8. Supplémentary material.....	113
9. References	119
10. Résultats complémentaires	123
10.1. Hypothèse sur la cible de la protéase S41.....	123

10.1.1.	Activité hémolytique	123
10.1.2.	Dégradation de la fibrine	123
10.1.3.	Dissolution de la fibrine	124
11.	Discussion	127
Partie III : La Production de vésicules extracellulaires par le genre <i>Mycoplasma</i>.		135
Chapitre 1 : La vésiculation chez les mycoplasmes, preuve de concept		135
1.	Contexte et stratégie de recherche	135
2.	Introduction	137
3.	Matériel et méthodes	142
4.	Résultats	147
4.1.	Analyses des protéines membranaires des vésicules	147
4.2.	Vésiculation et phase de croissance	150
4.3.	Méthode de détection et de quantification relative des VEs	153
4.4.	La production de vésicules, mécanisme actif ?.....	155
4.4.1.	Choc thermique	156
4.4.2.	Stress antibiotique	157
4.4.3.	Stress pH	157
4.5.	Observation de la formation de vésicules	159
5.	Discussion	160
Chapitre 2 : Amélioration des conditions de production et purification des vésicules.		165
1.	Contexte et stratégie de recherche	165
2.	Introduction	167
3.	Matériel et Méthodes	171
4.	Résultats	175
4.1.	Recherche de conditions permettant d'éviter la phase de déclin pour la production de vésicules	175
4.2.	Que se passe-t-il en phase de déclin ?	177
4.3.	Purification	180
4.3.1.	Purification sur gradient discontinu.....	180
4.3.2.	Purification sur gradient continu	183
4.4.	Utilisation du milieu OptiMEM	185
4.4.1.	Production de vésicules en milieu OptiMEM	185
4.4.2.	Comparaison de la production de VEs entre le milieu m-PPLO et optiMEM	186
5.	Discussion	190
5.1.	La recherche de paramètres influençant la production de VEs	190
5.2.	La recherche d'une approche de purification des VEs	191
Partie IV : Discussion générale		195

Abbreviations:

A, C, T, G, U	Adénine, Cytosine, Thymine, Guanine, Uracile
AC	Agalaxie Contagieuse
ADN	Acide désoxyribonucléique
APSM	Milieu appauvri sans MEM
ARN	Acide ribonucléique
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
BCA	Bicinchoninic acid assay
BEND	Bovine endometrium cell line
BPIE	Bronchopneumonies infectieuses enzootiques
CAP	Community acquired pneumonia
CARDS	Community Acquired Respiratory Distress Syndrom
CFU	Colony forming unit
Ck (Ckid)	California kid
CMRL	Milieu connaught medical research laboratories
CPS	Polysaccharides capsulaires
C-term	Extrémité carboxy-terminale
DHAP	Dihydroxyacetone phosphate
DTT	Dithiothréitol
DUF	Domain of unknown function
EBL	Cellules embryonnaires pulmonaires bovines
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPS	Polysaccharides extracellulaires
FBA	Fructose-1,6-biphosphate adolase
FTC	Fluorescein thiocarbamoyl
HCl	Acide chlorhydrique
HeLa	Cellules Henrietta Lacks
HEPES	Hydroxyethylpiperazine ethane sulfonic acid
HGT	Transfert horizontale de gènes
IgG	Immunoglobuline G
KCl	Chlorure de potassium
kDa	Kilo Dalton
LC	Chromatographie liquide
LPS	Lipopolysaccharides
LQ	Linear trap quadrupole
MAKEPS	Mammites, arthrites, kératoconjunctivites, pneumonies et septicémies
MCAP	Dénomination des gènes de <i>Mycoplasma capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i> Ckid
Mcc	<i>Mycoplasma capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i>
Mccp	<i>Mycoplasma capricolum</i> subsp. <i>capripneumoniae</i>
MEM	Minimum essential medium
MES	Acide 2-éthanosulfonique
MET	Microscopie électronique
MLC	Dénomination des gènes de <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>capri</i> 95010

Mmc	<i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>capri</i>
Mmm	<i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i>
Mmm LC	<i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>Mycoides</i> large colony
m-PPLO	Milieu PPLO modifié
MSC	Dénomination des gènes de <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> PG1
MS-MS	Spectrométrie de masse en tandem
NaCl	Chlorure de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
NETs	Neutrophil extra-cellular traps
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
NHBE	Normal Human Bronchial Epithelial Cells
NOX	NADH-oxydase
N-term	Terminaison amine
OIE	Organisation mondiale de la santé animale
OptiPrep	Iodixanol solution
PA	Pneumonie atypique
PAGE	Electrophorèse en gel de polyacrylamide
PAI	Index d'abondance protéique
pb	Paire de bases
PBS	Tampon phosphate salin
PCR	Polymerase chain reaction
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PPCB	Péripneumonie contagieuse bovine
PPCC	Pleuropneumonie contagieuse caprine
PPLO	Pleuropneumonia like Organism
PtsG	Glucose phosphotransférase
RA	Relative activity
RFU	Relative fluorescence units
rpm	Rotation par minute
SDS	Dodécysulfate de sodium
SPI	Signal peptidase I
SRP	Signal reconing particule
TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TGX	Tris-glycine extended shelf life
TLR	Récepteurs de type Toll
TMB	Région transmembranaire
tPA	Activateur tissulaire du plasminogène
Tris	Trisaminométhane
Triton X114	Polyethylene glycol <i>tert</i> -octylphenyl ether
TrmFO	Methylenetetrahydrofolate-tRNA-(uracil-5-)-methyltransferase
uPA	Activateur de plasminogène de type urokinase
VE	Vésicule extracellulaire
Vigimyc	Réseau d'épidémiosurveillance des mycoplasmoses des ruminants en France
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

Liste des figures:

Figure 1 : Arbre phylogénétique de la classe des <i>Mollicutes</i>	26
Figure 2 : Observation de colonies de <i>M. mycoides</i> subsp. <i>capri</i>	29
Figure 3 : Carte de la répartition mondiale de la PPCB.....	33
Figure 4 : Carte de la répartition mondiale de la PPCC.....	39
Figure 5: Schématisation du détournement du plasminogène.....	51
Figure 6: Schématisation de la variation de surface	56
Figure 7 Observation de biofilm	63
Figure 8 : Représentation schématique de la voie de production de peroxyde d'hydrogène chez les mycoplasmes.....	68
Figure 9: Le concept de sécrétome chez les Gram -	70
Figure 10: Le sécrétome des mycoplasmes.....	71
Figure 11 : Représentation schématique de la voie de sécrétion SEC.....	76
Figure 12: Les voies de sécrétion des Gram -	77
Figure 13: Paper Table 1	97
Figure 14: Paper Fig. 1.....	98
Figure 15: Paper Table 2	99
Figure 16: Paper Table 3	103
Figure 17: Paper Fig. 2.....	105
Figure 18: Paper Table 4	106
Figure 19: Paper Table 5.....	108
Figure 20: Paper Fig. 3.....	109
Figure 21: Paper Fig. S1.....	113
Figure 22: Paper Fig. S2.....	114
Figure 23: Paper Table S1.....	117
Figure 24: Activité hémolytique de <i>Mmc</i> et <i>Mcc</i>	124
Figure 25: Dégradation de la fibrine par <i>Mmc</i> et <i>Mcc</i>	125
Figure 26: Digestion du réseau de fibrine par <i>Mcc</i> Ck et Ck-mut.	126
Figure 27: Observation des VEs de 8 souches.	139
Figure 28: Diamètre des VEs.....	139
Figure 29: Stratégie d'étude des vésicules extracellulaires	144
Figure 30 : Comparaison de la croissance de <i>Mmm</i> Afadé TR en milieu PPLO et m-PPLO	150

Figure 31: Observations par microscopie électronique des VEs de <i>Mmm</i> en fonction du stade de croissance.....	151
Figure 32: Effet de la filtration sur la taille des VEs.	152
Figure 33 : Production de VEs de <i>Mmm</i> en fonction des trois phases de croissance.....	154
Figure 34: Stress et production de VEs	156
Figure 35 : Choc thermique et production de VEs.....	157
Figure 36 : Evolution du titre et du pH d'une culture de <i>Mmm</i> lors du stress pH.....	158
Figure 37: Observation par microscopie électronique de cultures en phase stationnaire de croissance de <i>Mmm</i> Afadé.....	159
Figure 38 : Comparaison de la croissance de <i>Mmm</i> en milieu m-PPLO et en milieu APSM.	175
Figure 39 : Comparaison de la production de vésicules extracellulaires en milieu m-PPLO et en milieu APSM.....	176
Figure 40 : Titre et pH de <i>Mmm</i> en milieu m-PPLO et APSM.....	178
Figure 41 : VEs en milieu m-PPLO et APSM.....	178
Figure 42 : Histogramme montrant la répartition de la taille des vésicules issues d'un milieu APSM à pH 6,8 et APSM à pH 7,5	179
Figure 43 : Gradient discontinu.	181
Figure 44 : SDS-PAGE des VEs isolées après purification sur gradient discontinu	181
Figure 45 : Marquage à la protéine G.	182
Figure 46: Marquage au 3F3 des différentes fractions du gradient de densité continu	183
Figure 47: SDS-PAGE des différentes fractions du gradient continu..	184
Figure 48: Microscopie électronique de la fraction 9 du gradient de densité continu.....	184
Figure 49: Production de VEs en milieu OptiMEM.	185
Figure 50 : Observations par microscopie électronique des VEs obtenues à partir du milieu OptiMEM	186
Figure 51: Séparation des VEs à partir des milieux m-PPLO et OptiMEM par un gradient continu en Optiprep.	187
Figure 52 : Observations par MET des fractions du gradient de densité (OptiMEM et m-PPLO).	188
Figure 53 : Observation par MET de la fraction 14 en milieu m-PPLO.....	189
Figure 54 : Observation par microscopie électronique (<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i>).	192

Liste des Tableaux :

Tableau 1: La classe des <i>Mollicutes</i> et la répartition de ses ordres et familles :	25
Tableau 2: Répartition du nombre d'espèces dans chacun des genres appartenant aux <i>Mollicutes</i> ...	31
Tableau 3: Tableau récapitulatif des espèces du genre <i>Mycoplasma</i> isolées chez les ruminants et les signes cliniques ou maladies associées.....	43
Tableau 4: Tableau récapitulatif du nombre de clivages et de la capacité d'adhésion des paralogues des adhésines P97 et P102:	52
Tableau 5: Facteurs de virulence décrits durant cette introduction	72
Tableau 6: Comparaison des études du sécrétome	74
Tableau 7: Liste des souches utilisées pour la préparation de vésicules.....	140
Tableau 8: Liste des protéines membranaires ou associées à la membrane issues des VEs.....	148
Tableau 9: Principales méthodes utilisées pour la purification des VEs.....	169
Tableau 10: Composition des milieux PPLO, m-PPLO, APSM et OptiMEM.....	171

PARTIE I

Partie I : Introduction générale :

Petites et sans paroi, les bactéries qui nous intéressent dans ce travail, appartiennent à la classe des *Mollicutes*. Cette classe comprend 11 genres dont le genre *Mycoplasma* (*M.*) qui regroupe de nombreuses espèces pathogènes pour les ruminants, les modèles de prédilection des UMR ASTRE et Mycoplasmoses des Ruminants. Les bactéries appartenant au genre *Mycoplasma* sont communément appelées « mycoplasmes ».

Au cours de cette introduction, nous présenterons dans un premier temps la classe des *Mollicutes*, les mycoplasmes et les mycoplasmoses induites chez les ruminants. Puis, dans un second temps, nous nous intéresserons à l'interaction entre les mycoplasmes et leur hôte et notamment les différents facteurs de virulence ainsi que le sécrétome de ces bactéries en nous appuyant sur les connaissances actuelles.

1. Les mycoplasmes :

1.1. Découverte des mycoplasmes :

La péripneumonie contagieuse bovine ou PPCB est une maladie grave, dont les premières descriptions datent du 18^{ème} siècle (De-Haller 1773). Ce n'est qu'à la fin du XIX^{ème} siècle, à l'aide de milieux de culture appropriés que Nocard et Roux réussissent à isoler et à cultiver l'agent responsable de la PPCB (Nocard, Roux et al. 1898). Pour cela, ils utilisent une technique de culture originale, ils placent dans le péritoine de lapins des sacs de collodion renfermant du bouillon de culture et un extrait de sérosité péripneumonique. Ces mêmes chercheurs réussissent par la suite à mettre au point un milieu supplémenté en sérum, plus adapté à la culture *in vitro* de l'agent de la PPCB et en obtiennent une culture pure. En 1900, après une culture sur milieu gélosé, la morphologie de l'agent de la PPCB est enfin décrite (Dujardin-Beaumetz 1900, Bordet 1910). Une de ses caractéristiques est son ultra-filtrabilité, il n'est pas retenu sur des filtres en porcelaine de Chamberland retenant habituellement les autres bactéries. Ainsi, entre la première description, l'isolement et la mise en culture de la bactérie responsable de l'infection, 140 ans se sont écoulés. Depuis, les avancées en microbiologie et en génétique, ont permis de caractériser plus avant l'agent de la PPCB, bactérie sans paroi dotée d'un petit génome. Son histoire et sa découverte comme premier représentant d'un genre qui ne sera décrit que plus tard ont fait que l'agent de la PPCB est devenu l'espèce type du genre *Mycoplasma*.

Le positionnement de l'agent de la PPCB, considéré au début comme un virus car ultra-filtrable, dans la taxonomie des bactéries a été très compliqué. Cette classification a longtemps été basée sur la comparaison de caractéristiques morphologiques (taille, coloration...). Or, au fil du temps, un grand nombre de bactéries de taille identique à celle de l'agent de la PPCB et ne possédant pas de paroi ont été découvertes, répertoriées, puis classées parmi les « PleuroPneumonia Like Organisms » en raison de leur ressemblance à l'agent de la PPCB (Edward 1954). De plus, en 1935, la forme L des bactéries est décrite, il s'agit de variants dépourvus de paroi. Les mycoplasmes sont alors proposés comme étant des formes L c'est-à-dire des formes « dégénérées » issues de bactéries Gram + ayant perdu leur paroi (Klieneberger 1935, Klieneberger-Nobel 1960). Il faut attendre la fin des années 60 et l'hybridation ADN/ADN pour définitivement différencier les mycoplasmes des bactéries de forme L, d'une part et établir leur positionnement taxonomique au sein des procaryotes, d'autre part (McGee, Rogul et al. 1965, Rogul, McGee et al. 1965, Reich, Somerson et al. 1966). L'ordre des *Mycoplasmatales* est finalement défini en 1955, le genre *Mycoplasma* en est le genre type (Freundt 1955). L'espèce *Mycoplasma mycoides*, dont fait partie l'agent étiologique de la PPCB, sera l'espèce type du genre *Mycoplasma*. Puis la classe des *Mollicutes* est définie en 1967 par le Comité International de bactériologie (Edward 1967). Depuis lors, ce classement est en constante évolution, affiné par l'amélioration des techniques d'analyse génétique.

1.2. Classification des Mollicutes :

Les bactéries appartenant à la classe des *Mollicutes* seront nommées « mollicutes » dans ce document. Le terme *Mollicutes* vient du latin et signifie « peau souple ». Il fait référence à une des caractéristiques majeures de cette classe qui est l'absence de paroi. Les cellules de mollicutes sont délimitées par leur membrane cytoplasmique. La classe des *Mollicutes* comprend de nombreuses bactéries, isolées chez divers hôtes (les plantes, les insectes et les vertébrés, comme indiqué dans le Tableau 1), qu'il faut positionner dans la classification. La classification d'organismes ou taxonomie permet de décrire des groupes d'organismes distincts et de leur attribuer une nomenclature. La taxonomie des mollicutes a longtemps consisté en une répartition dépendante de leur habitat, de leur besoin en cholestérol, du poids moléculaire de leur génome et de leurs propriétés antigéniques (Razin 1978). Ainsi la classe des *Mollicutes* est constituée de 4 ordres bactériens (Tableau 1) comprenant les *Acholeplasmatales*, les *Anaeroplasmatales*, les *Entomoplasmatales* et les *Mycoplasmatales* (Razin, Yogev et al. 1998).

L'ordre des *Entomoplasmatales* comprend deux familles, les *Entomoplasmataceae* et les *Spiroplasmataceae*. Les ordres *Acholeplasmatales*, *Anaeroplasmatales* et *Mycoplasmatales* comprennent chacun une seule famille, les *Acholeplasmataceae*, les *Anaeroplasmataceae* et les *Mycoplasmataceae* respectivement. Parmi les différents ordres, l'ordre des *Mycoplasmatales* est l'ordre type des *Mollicutes*.

Tableau 1: La classe des *Mollicutes* et la répartition de ses ordres et familles : (Bergey's 2010)

Ordre	Famille	Habitat
<i>Mycoplasmatales</i>	<i>Mycoplasmataceae</i>	Vertébrés
<i>Entomoplasmatales</i>	<i>Entomoplasmataceae</i>	Insectes et plantes
	<i>Spiroplasmataceae</i>	Insectes et plantes
<i>Acholeplasmatales</i>	<i>Acholeplasmataceae</i>	Vertébrés, Insectes et plantes
<i>Anaeroplasmatales</i>	<i>Anaeroplasmataceae</i>	Vertébrés

Cette classification n'est cependant pas adaptée à toutes les bactéries. Comme certains mollicutes restent non cultivables, ils sont difficiles à positionner. Il existe maintenant un consensus sur le fait que la taxonomie devrait refléter la phylogénie. Cette dernière est souvent basée sur des séquences d'ADN et leur amplification par PCR ce qui permet de classer des espèces pourtant non cultivables.

La phylogénie reflète les relations de parenté entre plusieurs individus et permet de retracer leur histoire évolutive. Initialement, c'est la séquence du gène de l'ARN ribosomique 16S qui a été utilisée pour la phylogénie (Weisburg, Tully et al. 1989). L'évolution des mollicutes a longtemps été considérée comme uniquement régressive, par perte de gènes à partir d'un ancêtre commun Firmicutes à Gram + et à faible teneur en G+C (Guanine + Cytosine) (Woese 1987, Weisburg, Tully et al. 1989). Les observations de transfert horizontal de gènes entre espèces appartenant ou non à la classe des *Mollicutes* et partageant la même niche écologique, nuancent l'hypothèse initiale d'une évolution uniquement régressive (Sirand-Pugnet, Lartigue et al. 2007, Citti, Dordet-Frisoni et al. 2018). Il est intéressant de noter que ces bactéries évoluent plus rapidement que d'autres espèces proches comme celles appartenant au genre *Lactobacillus* (Woese 1987, Ciccarelli, Doerks et al. 2006). En effet, les mollicutes sont positionnés parmi les plus longues branches de l'arbre universel de vie comparant 191 espèces sur la base de 31 gènes orthologues (Ciccarelli, Doerks et al. 2006). D'autres approches, parmi lesquelles l'utilisation des séquences de 60 gènes codant pour des protéines conservées, ont également permis de dresser des arbres phylogénétiques basés sur le core génome en utilisant ainsi de plus en plus d'informations (Gupta, Sawhani et al. 2018).

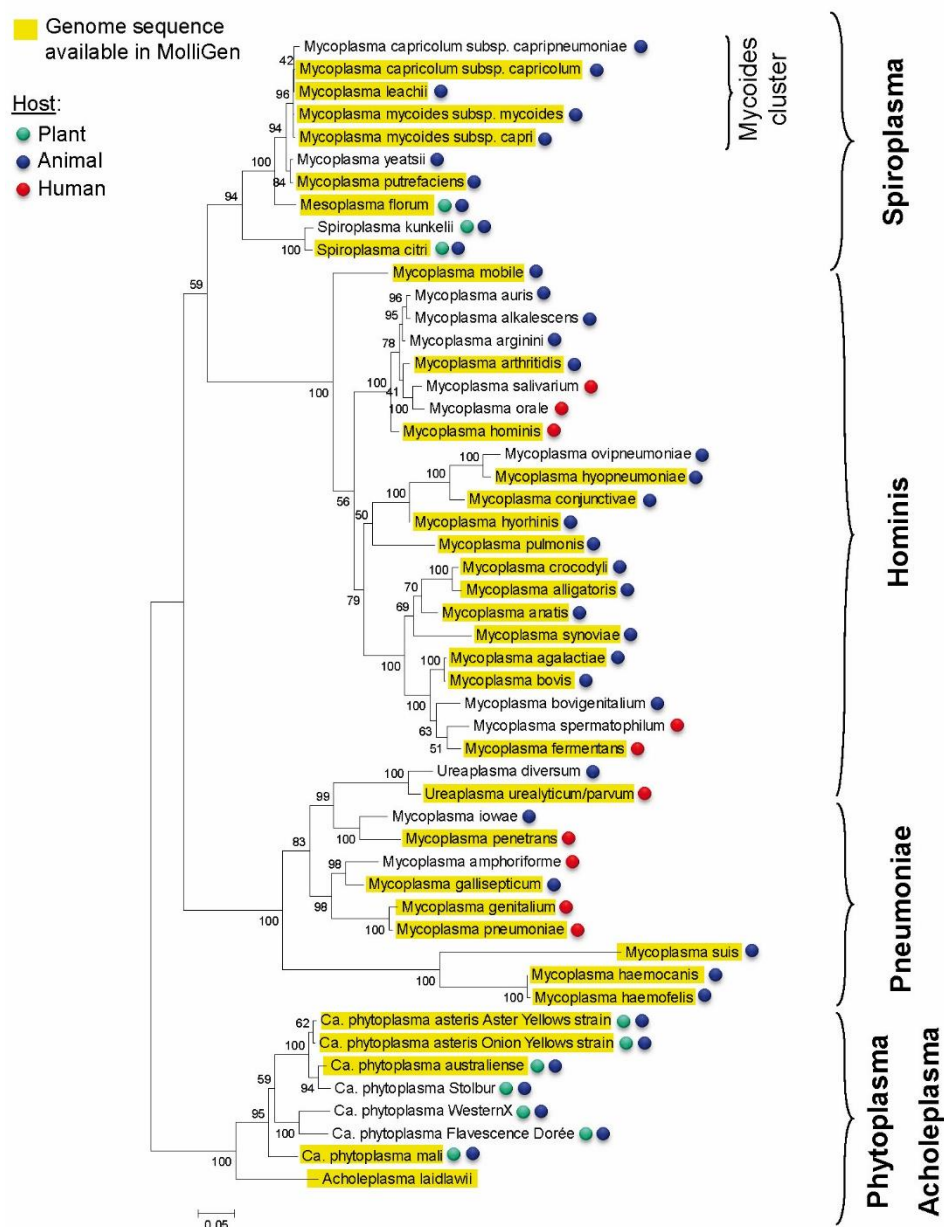


Figure 1 : **Arbre phylogénétique de la classe des Mollicutes.** Basé sur les séquences d'ADNr 16S. Cet arbre est issu de la base de données MolliGen (MolliGen , Barré, de Daruvar et al. 2004)

Plusieurs scénarios phylogénétiques ont été proposés en fonction des gènes étudiés mais l'ensemble de ces approches met en évidence des topologies d'arbres convergentes, permettant de distinguer quatre groupes phylogénétiques : Spiroplasma, Hominis, Pneumoniae et Phytoplasma/Acholeplasma (Weisburg, Tully et al. 1989, Gupta, Sawnani et al. 2018). Cependant, ces analyses phylogénétiques font ressortir certaines discordances avec la taxonomie actuelle. En effet, *M. mycoides* et d'autres mycoplasmes très proches (*M. capricolum* et *M. leachii*) ont été positionnés dès les années 1972 au sein du genre *Mycoplasma* (Freundt 1972).

Or, ces espèces isolées chez les ruminants, sont plus proches phylogénétiquement d'espèces du genre *Spiroplasma* et *Mesoplasma*, isolées des plantes ou des insectes, que d'autres espèces du genre *Mycoplasma* également isolées chez les Ruminants comme le montre l'arbre phylogénétique de la Figure 1. L'espèce *M. mycoides*, comprenant l'agent de la PPCB reste l'espèce type du genre *Mycoplasma* malgré sa proximité avec le genre *Spiroplasma*. La réévaluation de la taxonomie de cette espèce ainsi que des espèces *M. capricolum* et *M. leachii* pour être plus en accord avec la phylogénie (les ajoutant au groupe *Spiroplasma*) est complexe et n'est pas actée en raison du sens historique de certaines dénominations. La modification de la taxonomie d'espèces appartenant à l'ordre des *Mycoplasmatales* a par ailleurs été récemment rejetée par le comité de taxonomie à cause des problèmes médicaux et réglementaires que cette modification pourrait induire (Balish, Bertaccini et al. 2019).

Dans d'autres cas, la phylogénie a permis de faire évoluer la taxonomie. Un exemple discutable concerne certaines bactéries non cultivables appartenant auparavant au genre *Haemobartolla* et *Eperythrozoon* qui ont été réassociées aux mollicutes et au genre *Mycoplasma* sur la base de la comparaison de l'ARNr 16S. Il a été proposé que ces bactéries soient renommées *Mycoplasma* afin d'être en cohérence avec les études les associant au groupe phylogénétique *Pneumoniae* (Neimark, Johansson et al. 2001). Cependant seule une petite portion (l'ARNr 16S) du génome a été utilisée et le faible pourcentage de similarité rend discutable ce changement majeur (Uilenberg, Thiaucourt et al. 2006).

La phylogénie a également été utilisée afin d'améliorer et de réarranger la classification de bactéries très proches appartenant au cluster *M. mycoides*. Ce cluster comme décrit en 1987 par Cottew comprend plusieurs (sous)espèces isolées chez les ruminants qui sont proches de l'agent de la PPCB (Cottew, Breard et al. 1987). En 1987, ce cluster comprenait :

- L'agent de la PPCB, *M. mycoides* subsp. *mycoides* biotype « Small colony » (*MmmSC*)
- *M. mycoides* subsp. *mycoides* biotype « Large colony » (*MmmLC*), un des agents de l'agalactie contagieuse
- *M. mycoides* subsp. *capri* (*Mmc*), un des agents de l'agalactie contagieuse
- *M. capricolum* subsp. *capricolum*, (*Mcc*), un des agents de l'agalactie contagieuse
- L'agent de la pleuropneumonie contagieuse caprine *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae*
- Les mycoplasmes appartenant au séro groupe 7 classés par Leach en 1967 et représentés par la souche type PG50^T (Leach 1967).

Pour l'étude du cluster *M. mycoides*, la phylogénie basée sur la séquence de l'ARNr 16S n'a pas permis de discriminer les différents membres (Pettersson, Leitner et al. 1996). Avec une phylogénie utilisant plus de données comme l'utilisation des séquences de 5 gènes de ménages (*fusA*, *glpQ*, *gyrB*, *lepA* et *rpoB*), il a été possible de clarifier cet arbre (Manso-Silván, Perrier et al. 2007). Grâce à ces analyses, une révision majeure du cluster *M. mycoides* et de ses membres a été proposée en 2009 (Manso-Silvan, Vilei et al. 2009). Une nouvelle espèce a été nommée *M. leachii* et regroupe les mycoplasmes appartenant auparavant au séro groupe 7 de Leach. Les taxons *Mmm*LC et *Mmc* ont été regroupés au sein d'une même sous-espèce *M. mycoides* subsp. *capri* laissant la sous-espèce *M. mycoides* subsp. *mycoides* uniquement pour l'agent de la PPCB. Ces réarrangements ont pour conséquence de changer la composition du cluster *M. mycoides* comprenant désormais 5 membres et 3 espèces : *M. mycoides* subsp. *mycoides* (*Mmm*), *M. mycoides* subsp. *capri* (*Mmc*), *M. capricolum* subsp. *capricolum* (*Mcc*), *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* (*Mccp*) et *M. leachii* (Manso-Silvan, Vilei et al. 2009). Une étude phylogénétique récente a proposé qu'une 4^{ème} espèce, *M. feriruminatoris* sp. nov. appartienne au cluster *M. mycoides* (Ambroset, Pau-Roblot et al. 2017).

1.3. Le genre *Mycoplasma* :

Les bactéries appartenant au genre *Mycoplasma* partagent de nombreuses caractéristiques avec les autres mollicutes comme leur petite taille, leur absence de paroi, leur petit génome ou encore leur contenu en G+C mais possèdent également certaines particularités qui leur sont propres.

La plupart de ces bactéries forment des colonies à l'aspect typique d'« œuf sur le plat » (Figure 2). En fonction de la composition du milieu, cela se produit lors des premières étapes du développement de la colonie, lorsque les bactéries s'enfoncent dans la gélose verticalement avant de s'étaler horizontalement. Ceci génère un centre foncé se différenciant d'une périphérie plus claire. En plus de la forme particulière de certaines colonies, les mycoplasmes, tout comme les autres mollicutes, ont une petite taille cellulaire. Celle-ci est généralement comprise entre 0,3µm et 0,8µm. D'autres micro-organismes tels que les *Staphylococcus spp.* ont une taille de l'ordre de 0,5 à 1,5 µm de diamètre (Harris, Foster et al. 2002).

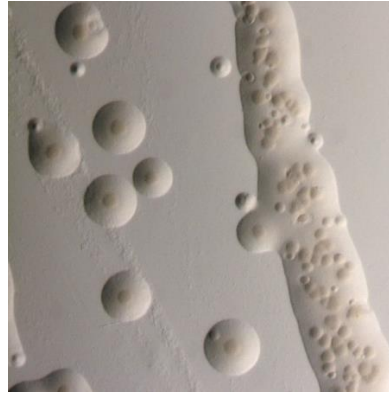


Figure 2 : **Observation de colonies de *M. mycoides subsp. capri* à l'aspect typique d'"oeuf sur le plat"** (grossissement x50)
(Crédits photo : A. COLIN)

Une autre caractéristique partagée avec les autres membres de la classe des *Mollicutes* est l'absence de paroi. La coloration de Gram, différenciant les bactéries selon la composition de leur paroi, n'est donc pas informative pour l'étude de ces bactéries. Les cellules mycoplasmiques, n'ont pas non plus de forme définie, on parle de pléomorphie. Leur petite taille et leur capacité à se déformer leur permettent de passer au travers de filtres de 0,2µm de porosité. La membrane des mycoplasmes est de composition différente de celle d'autres bactéries : au lieu de contenir des hopanoïdes, elle est riche en cholestérol.

Les mycoplasmes (comme les autres mollicutes) sont dotés de génome particulier car de petite taille compris entre 513 et 1300kpb avec un pourcentage en G+C de l'ordre de 23–40%. Le plus petit génome des mycoplasmes décrit à ce jour (513 kpb), est celui de *Candidatus Mycoplasma haemominutum*. Le plus grand génome (1358 kpb) est celui de *M. penetrans* (Bergey's 2010). L'information génétique des mycoplasmes est contenue dans un chromosome circulaire ; pour certaines espèces proches ou appartenant au cluster *M. mycoides* la présence de plasmides a été décrite mais cela reste rare et ces plasmides sont cryptiques et de petite taille (Breton, Tardy et al. 2012). Les mycoplasmes sont dotés d'un code génétique différent du code universel. Le codon UGA spécifie le codon tryptophane au lieu d'un codon STOP (Yamao, Muto et al. 1985).

Les bactéries du genre *Mycoplasma* ont évolué par perte de gènes à partir d'un ancêtre commun Gram+ à faible teneur en G+C. Par conséquent, de nombreuses voies métaboliques ont été perdues. Par exemple, les mycoplasmes ne disposent pas des voies de biosynthèse de la paroi.

Les mycoplasmes sont dépendants de leur hôte ou de l'environnement pour l'apport en cholestérol et en acides gras exogènes. Ils ont également besoin de précurseurs d'acides nucléiques et de peptides pour leur croissance (Razin, Yogev et al. 1998, Yus, Maier et al. 2009). Leur culture *in vitro* repose donc sur des milieux mimant les apports fournis *in vivo* par l'hôte. Ces milieux contiennent, pour certains, de l'infusion de cœur de bœuf, des peptones de caséines, de l'extrait de levure ainsi que du sel sous forme de chlorure de sodium. A ces milieux déjà riches sont ajoutés du sérum et de l'extrait de levure fraîche, apportant les acides gras et le cholestérol, sous une forme non toxique, des peptides, vitamines et coenzymes ainsi que des bases pour la synthèse d'ADN. De par les nombreuses exigences nutritionnelles, la culture des mycoplasmes est longue et fastidieuse, le temps de génération *in vitro* varie entre 1 à 10 heures. Une seule espèce, *M. feriruminatoris* sp. nov., décrite récemment, présente un temps de génération plus rapide (inférieur à 30 minutes) (Jores, Fisher et al. 2012) se rapprochant de celui d'autres espèces bactériennes comme *Escherichia coli* (environ 20 minutes).

Malgré leurs exigences nutritionnelles, certains mycoplasmes s'adaptent tout de même à l'hôte animal et peuvent être à l'origine de signes cliniques graves, regroupés sous le nom générique de mycoplasmoses. Nous allons détailler ci-après certains exemples chez les ruminants parmi les espèces étudiées lors de cette thèse.

2. Les mycoplasmes des ruminants et les pathologies associées :

Au sein des Mollicutes le genre *Mycoplasma* comprend le plus grand nombre d'espèces (116, Cf. Tableau 2). Celles isolées chez les ruminants sont majoritaires, puisque vingt-quatre ont été référencées en 2010 (Bergey's 2010). Certaines espèces induisent des mycoplasmoses majeures réglementées ou ayant de fortes conséquences économiques. D'autres, quoique pathogènes, sont isolées moins fréquemment et ont des conséquences économiques moindres. Enfin, d'autres espèces sont commensales. La frontière entre espèce pathogène, pathogène opportuniste ou espèce commensale restant parfois subtile.

Tableau 2: **Répartition du nombre d'espèces dans chacun des genres appartenant au Mollicutes** (Bergey's 2010)

Ordre	Famille	Genre	Nombre d'espèce (valide ; <i>Candidatus</i>)	Taille du génom (kpb)	Besoin en cholestérol	Habitat
<i>Mycoplasmales</i>	<i>Mycoplasmataceae</i>	<i>Mycoplasma</i>	116 ; 9	580-1350	+	Vertébrés
		<i>Ureaplasma</i>	7 ; 0	760-1140	+	Vertébrés
	<i>Incertae sedis*</i>	<i>Eperythrozoon</i>	4 ; 0	ND	ND	Vertébrés
		<i>Haemobartonella</i>	1 ; 0	ND	ND	Vertébrés
<i>Entomoplasmatales</i>	<i>Entomoplasmataceae</i>	<i>Entomoplasma</i>	6 ; 0	870-900	+	Invertébrés et Plantes
		<i>Mesoplasma</i>	11 ; 0	825-930	-	Invertébrés et Plantes
	<i>Spiroplasmataceae</i>	<i>Spiroplasma</i>	37 ; 0	780-2220	+	Invertébrés et Plantes
<i>Acholeplasmatales</i>	<i>Acholeplasmataceae</i>	<i>Acholeplasma</i>	18 ; 0	1500-1650	-	Vertébrés, Invertébrés et Plantes
	<i>Incertae sedis</i>	" <i>Candidatus Phytoplasma</i> "	0 ; 27	530-1350	ND	Invertébrés et Plantes
<i>Anaeroplasmatales</i>	<i>Anaeroplasmataceae</i>	<i>Anaeroplasma</i>	4 ; 0	1500-1600	+	Vertébrés
		<i>Asteroleplasma</i>	1 ; 0	1500	-	Vertébrés

* : Affiliation à l'ordre des *Mycoplasmales* non formalisée. ND : Non Déterminé

2.1. Mycoplasmoses décrites chez les bovins :

Chez les bovins sont décrites deux mycoplasmoses majeures, la péripneumonie contagieuse bovine (PPCB) et les mycoplasmoses associées à *M. bovis*.

2.1.1. Péripneumonie contagieuse bovine :

La PPCB est la pathologie historique liée aux mycoplasmes (Cf. section 1.1). Elle touche principalement les bovins mais son agent étiologique, *M. mycoides* subsp. *mycoides* (Mmm) peut-être exceptionnellement retrouvé en portage asymptomatique chez les petits ruminants (caprins et ovins) (Perreau 1971). En France, la PPCB est classée comme danger sanitaire de catégorie 1 (Journal Officiel de la République Française, arrêté du 29 juillet 2013).

La PPCB est la seule maladie bactérienne réglementée et à déclaration obligatoire auprès de l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE) et pour laquelle il existe un statut sanitaire officiel ainsi que des programmes de lutte agréés. Les autres sont des maladies virales ou à prion. La procédure de reconnaissance officielle d'un statut sanitaire par l'OIE est une démarche volontaire des pays. Si un pays souhaite être considéré comme indemne de la PPCB, il doit fournir annuellement des preuves suffisantes de l'absence de la maladie sur son territoire. Cette reconnaissance de statut pour la PPCB est importante puisqu'un pays déclaré indemne par l'OIE est également reconnu par l'organisation mondiale du commerce (www.oie.int). Plusieurs pays sont déclarés indemnes de la maladie par l'OIE. C'est le cas des trois principaux producteurs de bovins, le Brésil, l'Inde et la Chine et en Europe de la France, de la Suisse et du Portugal ainsi que d'autres pays représentés en vert sur la Figure 3. D'autres pays européens sont certainement indemnes mais ne disposent pas d'un outil de surveillance suffisant pour s'en prévaloir auprès de l'OIE ou ne souhaitent pas en faire la démarche.

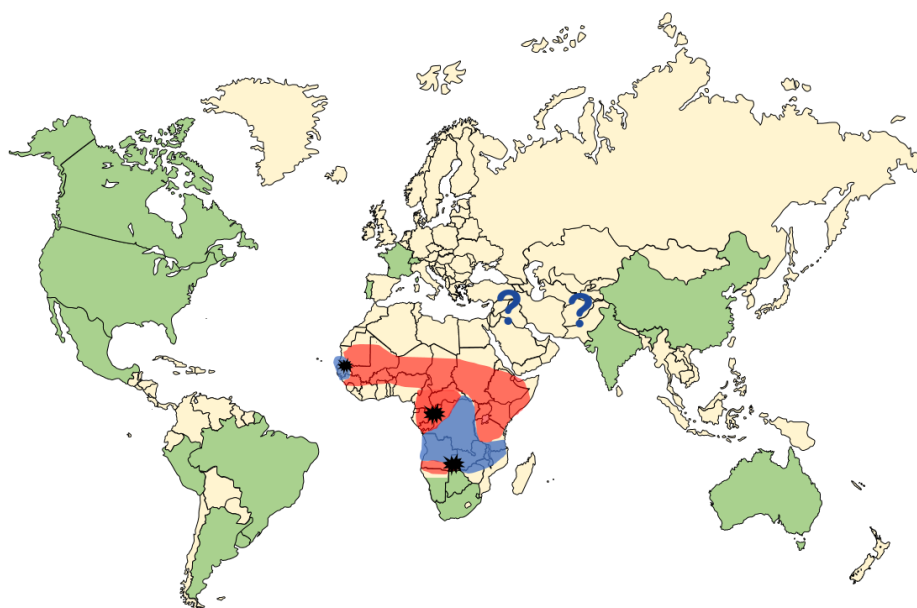


Figure 3 : Carte de la répartition mondiale de la PPCB. En vert sont représentés les pays déclarés indemnes de la maladie par l'OIE en 2019 (www.oie.int). En rouge sont présentées les zones touchées par la maladie. En bleu sont présentées les zones présentant un risque élevé de réintroduction. Les points noirs correspondent aux cas de réintroductions récentes. Les points d'interrogation correspondent aux zones suspectes.

Cependant, la PPCB sévit encore dans de nombreuses régions et est présente de façon endémique en Afrique subsaharienne avec un risque élevé de réintroduction jusqu'à la bande de Caprivi en Namibie (Figure 3).

Divers signes cliniques, tels qu'un amaigrissement et des difficultés respiratoires, permettent de suspecter la PPCB, bien que ces signes ne soient pas exclusifs à cette maladie. A l'autopsie, elle est caractérisée par une pleuropneumonie aigüe ou subaigüe qui résulte d'une inflammation exsudative séro-fibrineuse de la plèvre et des poumons (Curasson 1936, Provost 1987). Elle est transmise par contact entre animaux malades ou porteurs asymptomatiques et animaux sensibles via la projection de gouttelettes durant la toux. Différentes formes de la maladie existent : aigüe, subaigüe et chronique. La forme aigüe est divisée en trois phases, la phase d'invasion où les premiers signes cliniques apparaissent, la phase d'état où le poumon est hépatisé et la phase terminale évoluant vers la mort, la chronicité ou la guérison des animaux. La forme subaigüe correspond à des signes cliniques plus discrets. Il existe également une forme chronique où l'agent de la PPCB peut survivre plusieurs mois dans des séquestres pulmonaires. Durant la phase aigüe, l'impact de la maladie est directement mesurable contrairement à la forme chronique dont le suivi sur le terrain est plus difficile.

De ce fait, en l'absence de signes cliniques majeurs favorisant la détection de la maladie, celle-ci continue de se répandre dans le troupeau et de troupeaux en troupeaux lors de mouvements d'animaux rendant son suivi et son éradication difficiles.

Même lorsque la maladie semble éradiquée, des épisodes de réémergence peuvent apparaître comme ce fût le cas lors du dernier foyer Européen (1980 à 1999) (Regalla, Caporale et al. 1996). Au cours de cet épisode les analyses moléculaires ont montré que les souches provenaient d'un même ancêtre commun, Européen (Dupuy, Manso-Silvan et al. 2012).

Afin de détecter une éventuelle réémergence de la PPCB ou pour participer au suivi de la propagation de la maladie dans les zones touchées, des moyens de surveillance sont mis en place. Ils diffèrent en fonction de la situation sur le territoire. Ainsi dans des zones indemnes et non touchées, les moyens de surveillance consistent en un contrôle des carcasses en abattoir afin de chercher des lésions pulmonaires caractéristiques de la PPCB. En France, ces données sont complétées par la surveillance des mycoplasmoses au travers du réseau Vigimyc (Poumarat 2014). Tandis que dans des zones déjà touchées, le suivi consiste en un dépistage de la présence de l'agent de la PPCB, *Mmm* principalement par la détection d'anticorps spécifiques par le biais d'un sérodiagnostic (ELISA de compétition ou fixation du complément) (www.oie.int).

Pour éradiquer ou limiter la propagation de la PPCB, des stratégies de lutte sont mises en place. Elles reposent sur quatre outils, l'abattage des animaux infectés, le contrôle des mouvements des animaux, les traitements antibiotiques et la vaccination. Historiquement, les politiques d'éradication réussies ont été basées sur l'abattage des troupeaux infectés, comme cela a été effectué en Grande-Bretagne ou aux USA et le contrôle des mouvements d'animaux précédé ou non d'une campagne de vaccination permettant de diminuer la prévalence et réduire les coûts d'abattage, comme ce fût le cas en Australie en 1974. En Afrique, ces politiques sont difficiles à mettre en œuvre aussi bien pour des raisons économiques que sociales. Dans ce cas, les campagnes de lutte reposent essentiellement sur la vaccination utilisant les souches T1 (T1/44 et T1sr) mise en place par les services vétérinaires étatiques, ainsi que sur l'antibiothérapie utilisée par les éleveurs. Les vaccins T1 sont efficaces lorsque la vaccination est effectuée à l'échelle du troupeau et que les campagnes annuelles de revaccination utilisent des charges bactériennes adéquates. Ces conditions ne sont pas parfaitement remplies sur le terrain, expliquant les résultats décevants de la vaccination dans certaines zones.

2.1.2. Mycoplasmoses à *M. bovis* :

M. bovis est à l'origine d'une mycoplasmoses non réglementée pour le moment, malgré la répartition mondiale de la maladie et les répercussions économiques majeures qu'elle entraîne. Aux Etats-Unis, l'impact économique des infections à *M. bovis* était estimé, dans les années 2000, à 140 millions de dollars par an, associé à la baisse de la production laitière et de viande (Nicholas et Ayling 2003).

Le premier isolat de *M. bovis* date de 1961 lors de cas de mammites survenus aux Etats-Unis (Hale, Helmboldt et al. 1961). Cette espèce est répandue à travers le monde, de l'Europe en passant par l'Amérique du Nord et jusqu'en Nouvelle Zélande, touchée plus récemment. Les cas détectés en Nouvelle-Zélande en juillet 2017 ont eu pour conséquence la mise en place d'une stratégie d'abattage massif (pour le moment prévisionnelle) de plus de 100 000 têtes de bétail. En France, les données du réseau d'épidémiologie-surveillance, Vigimyc, indiquent que 50% des isolats mycoplasmatiques collectés lors d'épisode de pathologie respiratoire sont des *M. bovis* (Vigimyc 2017).

Les signes cliniques associés à une mycoplasmoses à *M. bovis* varient d'une zone géographique à l'autre. Ces signes cliniques peuvent se présenter sous forme de mammites, pneumonies, arthrites, otites ou encore de dommages génitaux conduisant dans certains cas à l'infertilité ou à l'avortement (Calcutt, Lysnyansky et al. 2018). En France, *M. bovis* est essentiellement à l'origine de bronchopneumonies infectieuses enzootiques (BPIE), 86% des souches identifiées comme *M. bovis* par le réseau Vigimyc sont isolées dans un contexte de troubles respiratoires. *M. bovis* induit des BPIE seul ou en association avec d'autres micro-organismes, 36% des souches identifiées comme *M. bovis* par le réseau Vigimyc étaient en association avec d'autres mycoplasmes (*M. arginini*, *M. bovirhinis*). Les BPIE peuvent être induites par différents agents, celles spécifiques à *M. bovis* sont plus difficiles à suivre et sont certainement sous estimées (Nicholas et Ayling 2003). En effet, l'isolement en première instance d'autres espèces bactériennes lors d'infections pulmonaires, sans une recherche spécifique de *M. bovis*, participe à ce constat.

Pour lutter contre cette espèce pathogène des bovins, de nombreuses études se sont intéressées au mode de transmission et au réservoir de *M. bovis*, facteurs participant à la dissémination de l'agent pathogène. La transmission de *M. bovis* s'effectue par contact entre animaux infectés et animaux sensibles via le mucus respiratoire ou le lait (Walz, Mullaney et al. 1997, Butler, Sickles et al. 2000). La survie dans l'environnement de *M. bovis* peut être un facteur de risque de transmission bien que cela n'ait été démontré expérimentalement. *M. bovis* persiste dans l'environnement et peut survivre à 4°C pendant presque 2 mois sur des éponges ou dans du lait ou de l'eau pendant plus de deux semaines (Pfutzner et Sachse 1996). *In vitro*, ce mycoplasme peut former des biofilms (McAuliffe, Ellis et al. 2006), ceci pourrait participer à sa persistance dans le milieu extérieur et compliquer son élimination.

Les moyens de lutte contre *M. bovis* sont limités car il n'existe pas de vaccination efficace commercialisée en France (Becker, Maillard et al. 2017, Perez-Casal, Prysljak et al. 2017). En revanche, dans d'autres pays, comme les Etats-Unis, des vaccins sont utilisés (Soehnlén, Aydin et al. 2011) mais leur niveau d'utilisation et leur efficacité sont peu décrits dans la littérature scientifique. En Europe, la lutte contre *M. bovis* repose essentiellement sur l'antibiothérapie ainsi que sur des mesures de biosécurité. Les traitements antibiotiques présentent pourtant l'inconvénient majeur de générer des bactéries résistantes, *M. bovis* est résistant à de nombreux composés (ex : tétracyclines, macrolides) même s'il reste majoritairement sensible aux fluoroquinolones (Gautier-Bouchardon, Ferre et al. 2014). La surveillance des résistances aux antibiotiques et notamment l'apparition d'isolats de *M. bovis* résistants aux fluoroquinolones est un sujet d'actualité (Khalil, Becker et al. 2016).

D'autres mycoplasmes et mollicutes sont isolés chez les bovins et ont fait l'objet de nos travaux, ils sont à l'origine de mycoplasmoses non réglementées et aux conséquences économiques moindres.

2.1.3. Mycoplasmoses à *M. leachii* :

M. leachii a été découvert historiquement en Australie en 1963 (Simmons et Johnston 1963). Cette espèce est isolée sporadiquement et est cantonnée à certaines zones géographiques. La distribution géographique de *M. leachii* est peu documentée, des cas d'infection ont été décrits en Chine, en Australie ou encore en Argentine (Hum, Kessell et al. 2000, Chang, Liu et al. 2011, Neder, Allasia et al. 2019). Mais d'autres cas ont dû survenir en Amérique, en Europe, en Afrique et en Inde puisque des études comparatives ont utilisé des isolats provenant d'Inde, d'Allemagne, du Nigéria, de la France et du Portugal (Djordjevic, Forbes et al. 2001, Djordjevic, Vilei et al. 2003, Manso-Silván, Perrier et al. 2007, Tardy, Gaurivaud et al. 2009).

M. leachii est un agent pathogène induisant des lésions de type mammites et arthrites (Connole, Laws et al. 1967, Manso-Silvan, Vilei et al. 2009). Mais bien qu'il induise des pertes économiques associées à ces lésions, peu de données permettent de mesurer le réel impact de ce mycoplasme car les mammites et polyarthrites sont des signes cliniques communs à de nombreuses bactéries et non exclusifs à *M. leachii* (Hum, Kessell et al. 2000). Aucun cas de mycoplasmoses à *M. leachii* n'a été identifié en France par le réseau Vigimyc depuis sa création en 2003 (Vigimyc 2013). La surveillance de ce mycoplasme chez les bovins reste une nécessité dans la mesure où son génome est très proche de celui de *Mmm* et que cette souche pourrait induire des réactions croisées avec certains tests diagnostics.

2.1.4. Mycoplasmoses à *M. alkalescens* :

M. alkalescens est un pathogène bovin induisant des arthrites et parfois des mammites, des pneumonies ou des otites. Le mode de transmission de *M. alkalescens* est peu documenté. En France, parmi les échantillons issus de prélèvements bovins, envoyés au réseau d'épidémiosurveillance Vigimyc pour expertise, 4% sont identifiés comme *M. alkalescens* (Vigimyc 2017).

2.1.5. Autres mollicutes :

D'autres mycoplasmes tels que *M. bovirhinis* et *M. arginini* sont des espèces opportunistes ou commensales souvent retrouvées en association avec d'autres espèces chez les bovins et dont le rôle dans l'établissement de mycoplasmoses n'est pas démontré. Parmi les échantillons issus de prélèvements bovins, envoyés au réseau d'épidémiosurveillance Français Vigimyc pour expertise, 34% sont identifiés comme *M. bovirhinis* et 13% comme *M. arginini* (Vigimyc 2017).

L'espèce commensale *A. laidlawii* appartenant à un autre genre a également été étudiée au cours de ce projet. Elle est isolée dans l'environnement et dans les tissus animaux et notamment chez les bovins au niveau de la sphère respiratoire et génitale (Vigimyc 2017). En France, elle est identifiée dans 0,3% des cas issus de prélèvements bovins envoyés au réseau Vigimyc (Vigimyc 2017).

2.2. Mycoplasmoses décrites chez les petits ruminants :

Chez les petits ruminants, deux mycoplasmoses majeures sont décrites, la pleuropneumonie contagieuse caprine (PPCC) et l'agalactie contagieuse (AC) ou syndrome MAKePS.

2.2.1. Pleuropneumonie contagieuse caprine :

La pleuropneumonie contagieuse caprine (PPCC) est une pathologie réglementée touchant les caprins faisant partie des 117 maladies à déclaration obligatoire auprès de l'OIE. Cette maladie a été décrite en Algérie au 19^{ème} siècle (Thomas 1873, Hutcheon 1881, Hutcheon 1889) mais son agent, *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* (*Mccp*), n'a été caractérisé qu'un siècle plus tard en 1976 par MacOwan et Minette (MacOwan et Minette 1976). La datation moléculaire a permis d'estimer que l'émergence de *Mccp* date d'il y a environ 270 ans (Dupuy, Verdier et al. 2015).

La PPCC touche spécifiquement les voies respiratoires des caprins et ruminants sauvages. Lors de la phase aiguë, la PPCC provoque des difficultés respiratoires associées à une augmentation de la température. Les lésions de la PPCC sont présentes dans la cage thoracique où une importante exudation est observée. Le plus souvent un seul poumon est atteint et peut être hépatisé dans sa totalité (Thiaucourt 2003). Une forme chronique est également possible et favorise l'établissement de réservoirs de l'agent pathogène au sein des troupeaux. *Mccp* a été isolé depuis 2004 au sein de la faune sauvage (bouquetin de Nubie, mouflon du Laristan et gazelle de Waller également appelée Gerenuk...) où il y induit la PPCC (Arif, Schulz et al. 2007, Lignereux, Chaber et al. 2018).

Comme pour la PPCB, la transmission de la PPCC s'effectue par contact entre animaux malades ou porteurs asymptomatiques et animaux sensibles via la projection de gouttelettes durant la toux. Il est notamment possible d'infecter expérimentalement des chèvres par la combinaison d'infections intranasales suivies d'infections transtracheales (Liljander, Sacchini et al. 2019). La PPCC entraîne une forte morbidité, qui, en l'absence de traitement efficace, peut aboutir à une forte mortalité de l'ordre de 80% (Thiaucourt et Bolske 1996).

Il existe un vaccin contre la PPCC, qui est constitué d'un antigène concentré et purifié et qui utilise la saponine à la fois comme agent d'inactivation et comme adjuvant. La protection induite est d'environ 1 an (Rurangirwa, McGuire et al. 1987, Thiaucourt et Bolske 1996). En pratique sur le terrain, les campagnes de vaccination, quand elles existent, ne sont pas efficaces notamment parce que les vaccins commerciaux disponibles sont de mauvaise qualité et contiennent une importante proportion de peptides issus du milieu de culture ou contiennent d'autres antigènes que ceux prescrits pour un vaccin PPCC (Thiaucourt, Pible et al. 2018)

2.2.2. Agalactie contagieuse :

L'Agalactie contagieuse (AC) affecte les petits ruminants et est réglementée par l'OIE. Comme pour la PPCC et la PPCB, l'AC est à déclaration obligatoire auprès de l'OIE. En France, l'AC à *M. agalactiae* est un danger sanitaire de deuxième catégorie à déclaration obligatoire (Journal Officiel de la République Française, arrêté du 4 mai 2017). L'AC touche à la fois les ovins et les caprins. Chez les ovins elle est principalement induite par *M. agalactiae*. Tandis que chez les caprins l'AC, également appelée syndrome « MAKePS » pour Mammites, Arthrites, Kératoconjunctivites, Pneumonies et Septicémies, peut être induite par 4 (sous)espèces (*Mmc*, *Mcc*, *M. putrefaciens* et *M. agalactiae*) (Thiaucourt et Bolske 1996, Bergonier, Berthelot et al. 1997).

M. agalactiae, l'agent historique, appartient au groupe phylogénétique *Hominis*, alors que *Mmc*, *Mcc* et *M. putrefaciens* appartiennent tous les trois au groupe phylogénétique *Spiroplasma*. En fonction de l'espèce en cause, la totalité ou une partie des signes cliniques pourront être observés. *M. putrefaciens* provoque principalement des mammites. Tandis que des manifestations pulmonaires sont plutôt observées en cas d'AC induites par *Mmc* ou *Mcc*. L'AC peut évoluer d'une forme inapparente ou asymptomatique jusqu'à la dissémination à d'autres organes et peut conduire à la mort des animaux touchés.

Une des voies de transmission des agents de l'AC peut être le lait contaminé, que ce soit par une transmission directe de la mère au petit ou de manière indirecte lors de la traite. Mais le portage et la faune sauvage constituent également des réservoirs des agents de l'AC. *Mmc* peut être isolé dans des oreilles de chèvre. Ces isolats issus de portage (sans signes cliniques) induisent à nouveau des lésions lorsqu'ils sont injectés en sous-cutané (Tardy, Maigre et al. 2011). Ce portage pourrait ainsi disséminer les agents bactériens lors de mouvements d'animaux. *M. agalactiae* a également été isolé au sein de la faune sauvage lors de lésions pulmonaires chez le bouquetin des Alpes (Tardy, Baranowski et al. 2012).

La maladie est suspectée lorsque divers signes cliniques, mammites, arthrites et infections oculaires sont présents chez différents animaux d'un même troupeau. Comme ce syndrome peut être induit par différents mycoplasmes, il est nécessaire de pouvoir identifier les (sous)espèces à l'origine de la maladie. Dans le cadre de la surveillance, plusieurs méthodes basées sur la détection d'une réponse immunitaire peuvent être utilisées. L'infection à *M. agalactiae* peut être détectée par test ELISA. Celles à *Mmc* et *Mcc* peuvent en théorie être détectées par des tests de fixation du complément (www.oie.int). Cependant, en pratique ces tests (s'intéressant à *Mmc*, *Mcc* et *M. putrefaciens*) sont peu réalisés en raison du manque de spécificité et du fait de l'absence de conséquences pratiques découlant de résultats positifs. Le diagnostic moléculaire a été mis au point pour identifier spécifiquement les différents agents de l'AC (Dedieu, Mady et al. 1995, Monnerat, Thiaucourt et al. 1999¹, Peyraud, Woubit et al. 2003, Woubit, Manso-Silvan et al. 2007, Maigre, Citti et al. 2008). Il est important de surveiller ce syndrome car celui-ci est à l'origine de nombreuses pertes économiques dans les pays exploitant les caprins et ovins pour leur lait, leur viande et leur peau. Bien que la région la plus touchée par l'AC reste le bassin méditerranéen, cette mycoplasmoses a été décrite sur tous les continents et des cas ont été recensés dans 55 pays (Bergonier, Berthelot et al. 1997). En France, les données du réseau d'épidémiologie-surveillance, Vigimyc, montrent qu'à partir des prélèvements caprins envoyés pour expertise, les agents de l'AC ont été identifiés dans les proportions suivantes en 2017 : *Mmc* 36%, *Mcc* 27%, *M. putrefaciens* 4,8%, *M. agalactiae* 1,4%) (Vigimyc 2017).

La vaccination est possible contre *M. agalactiae* et certains vaccins multivalents sont disponibles mais les données sur leur efficacité sont limitées (Agnone, La Manna et al. 2013) . En France, il n'y a pas de vaccin contre l'AC à *M. agalactiae* doté d'une autorisation de mise sur le marché (des vaccins étrangers, notamment espagnols et des auto-vaccins peuvent être utilisés) et peu de données permettent de connaître le niveau d'utilisation de la vaccination dans le cadre de l'AC.

D'autres mollicutes sont isolés chez les petits ruminants, caprins et ovins. Ces mollicutes peuvent entraîner des maladies mais leur réel pouvoir pathogène reste à démontrer.

2.2.3. Pneumonie atypique :

La pneumonie atypique (PA) des ovins est le plus souvent induite par *Mannheimia haemolytica* mais le rôle de *M. ovipneumoniae* dans l'établissement de la maladie reste à éclaircir. Dans certains cas, *M. ovipneumoniae* exacerbe les signes cliniques, ce qui favorise la colonisation par d'autres micro-organismes (Niang, Rosenbusch et al. 1997, Niang, Rosenbusch et al. 1998). Cette espèce semble par ailleurs, nécessaire à l'établissement de maladies respiratoires chez le mouflon canadien (Butler, Edwards et al. 2018). La pneumonie atypique est transmise par voie respiratoire et par des contacts répétés avec une prévalence plus importante lors de températures élevées et peut conduire à la mort des animaux (Nicholas, Ayling et al. 2008). En France, en 2017, *M ovipneumoniae* a été isolé dans 41% des cas cliniques ovins et à 7,5% des cas cliniques caprins dans le cadre du réseau Vigimyc (Vigimyc 2017).

2.2.4. Autres mollicutes :

M. arginini et *A. laidlawii*, sont également isolées chez les petits ruminants. En France, parmi les échantillons caprins envoyés au réseau Vigimyc pour expertise, 19,7% sont identifiés comme *M. arginini* et 0,7% comme *A. laidlawii* (Vigimyc 2017).

Durant cette deuxième partie de l'introduction de thèse, nous n'avons pas présenté tous les mycoplasmes pouvant être isolés chez les ruminants mais nous nous sommes focalisés sur ceux étudiés au cours de la partie expérimentale de cette thèse (Partie II et III). Les autres mycoplasmes pouvant être isolés chez les ruminants sont présentés dans le tableau 3.

Tableau 3: **Tableau récapitulatif des espèces du genre *Mycoplasma* isolées chez les ruminants et les signes cliniques ou maladies associées (Bergey's 2010)**

Groupe phylogénétique	(sous)espèce	Hôte principal	Maladie / signe(s) clinique(s)	Espèce étudiée durant la thèse
<i>Spiroplasma</i>	<i>Mccp</i>	Caprin	Pleuropneumonie contagieuse caprine (PPCC)	OUI
	<i>Mcc</i>	Caprin	Agalactie contagieuse (AC)	OUI
	<i>M. leachii</i>	Bovin	Pneumonie	OUI
	<i>Mmm</i>	Bovin	Péripleuropneumonie contagieuse bovine (PPCB)	OUI
	<i>Mmc</i>	Caprin	Agalactie contagieuse (AC)	OUI
	<i>M. putrefaciens</i>	Caprin	Agalactie contagieuse (AC)	OUI
	<i>M. cottewii</i>	Caprin	Commensale	NON
	<i>M. yeatsii</i>	Caprin	Opportuniste	NON
<i>Hominis</i>	<i>M. alkalescens</i>	Bovin	Pneumonie Arthrite Mammite Otite	OUI
	<i>M. arginini</i>	ubiquitaire	Opportuniste	OUI
	<i>M. ovipneumoniae</i>	Ovin	Pneumonie Atypique (PA) Pneumonie Conjonctivite Mammite	OUI
	<i>M. agalactiae</i>	Caprin	Agalactie contagieuse (AC)	OUI
	<i>M. bovis</i>	Bovin	Pneumonie Mammite	OUI
	<i>M. bovirhinis</i>	Bovin	Commensale	OUI
	<i>M. adleri</i>	Caprin	Arthrites	NON
	<i>M. auris</i>	Caprin	Commensale	NON
	<i>M. bovigenitalium</i>	Bovin	Mammites et infections génitales	NON
	<i>M. bovoculi</i>	Bovin	Conjonctivites	NON
	<i>M. californicum</i>	Bovin	Mammites	NON
	<i>M. canadense</i>	Bovin	Mammites et arthrites	NON
	<i>M. conjunctivae</i>	Caprin	Conjonctivites	NON
	<i>M. dispar</i>	Bovin	Pneumonies	NON
	<i>M. verecundum</i>	Bovin	Anémie	NON
<i>Pneumoniae</i>	<i>M. alvi</i>	Bovin	Commensale	NON
	<i>M. ovis</i>	Ovin	Pneumonies et conjonctivites	NON
	<i>M. wenyonii</i>	Bovin	Commensale	NON
<i>Phytoplasma</i> / <i>Acholeplasma</i>	<i>A. laidlawii</i>	Environnement	Commensale	OUI

Comme le résume le tableau 3, les mycoplasmes participent ou induisent de nombreuses maladies ou signes cliniques chez les ruminants. Certaines maladies ont des conséquences économiques importantes pour les filières d'élevage à travers le monde, une meilleure connaissance de la pathogénèse des mycoplasmes pour améliorer les stratégies de lutte est donc un enjeu économique primordial. Bien que les lésions cliniques soient très bien décrites, les mécanismes moléculaires participant aux lésions chez l'hôte restent quant à eux mal connus. Dans la suite de cette introduction seront présentées les avancées réalisées dans la caractérisation de facteurs de virulence de ces bactéries.

3. Concepts actuels de la virulence des mycoplasmes

Les facteurs de virulence sont classiquement définis comme des composés produits par la bactérie qui vont participer à la pathogénicité et induire des lésions sur un hôte sensible (Casadevall et Pirofski 2009, Browning, Noormohammadi et al. 2014). Ils vont « déplacer » l'interaction hôte-microorganisme vers une augmentation des dommages tissulaires de l'hôte. Leur identification permet de mieux comprendre comment ces bactéries sont capables, dans certains cas, d'induire des lésions chez l'hôte.

Une des stratégies permettant de mieux comprendre comment les mycoplasmes sont pathogènes chez leur hôte, a consisté en la comparaison de variants. Par exemple la comparaison de souches de *Mmm* réparties dans deux clusters, (l'un comprenant des souches du dernier foyer Européen, l'autre comprenant des souches d'origine Africaine) a mis en évidence la perte de gènes impliqués dans le métabolisme du glycérol chez les souches du dernier foyer européen. Cette comparaison a permis d'initier les recherches sur la production de peroxyde d'hydrogène et son rôle cytotoxique chez *Mmm* (Vilei et Frey 2001). Actuellement ce type d'approche est complété par des stratégies de comparaison des génomes et des protéomes. La comparaison du contenu génétique de souches pathogènes avec celui de souches n'induisant pas ou peu de lésions a permis de cibler des candidats potentiels participant à l'induction de dommages chez l'hôte (Li, Wang et al. 2016, Chen, Hao et al. 2018). L'analyse comparative *in silico* facilite la recherche de candidats mais reste une approche préliminaire qui nécessite des analyses fonctionnelles complémentaires consistant en la production de mutants ou de protéines recombinantes. La mutagénèse permet de mesurer l'impact d'un facteur de virulence potentiel sur la virulence bactérienne d'abord *in vitro* puis *in vivo* par comparaison de la souche mutante et la souche parentale (Papazisi, Frasca et al. 2002). Une étape de complémentation permet de s'assurer qu'aucune autre modification se produisant chez le mutant ne participe à la modification phénotypique observée. La production de protéines recombinantes, quant à elle, facilite l'étude de protéines cibles et permet la production d'anticorps qui pourront être utilisés pour inhiber *in vitro* le phénomène étudié (ex : adhésion) (Qi, Zhang et al. 2018).

Ces approches restent difficiles à mettre en œuvre car la culture des mycoplasmes est compliquée et les outils conventionnels de manipulation génétique (transformation, mutagenèse) habituellement utilisés pour d'autres bactéries restent laborieux à mettre en œuvre chez les mycoplasmes (Blötz, Lartigue et al. 2018). La biologie de synthèse, récemment développée pour les mycoplasmes et notamment *Mmc*, permet d'envisager une mutagenèse ciblée (Gibson, Glass et al. 2010, Lartigue, Valverde Timana et al. 2019). Quant à la production de protéines recombinantes en système hétérologue, il ne faut pas oublier que le codon UGA chez les mycoplasmes n'est pas un codon STOP mais spécifie le tryptophane, nécessitant ainsi la modification du gène à exprimer. Enfin, les études sur les animaux (bovins, petits ruminants) sont délicates d'un point de vue éthique et économique et nécessitent des infrastructures adaptées. De plus, les petits animaux (souris, lapins) ne sont pas de bons modèles pour ces maladies. Des tests de substitution utilisant des modèles plus simples comme la culture cellulaire ou d'organes *ex vivo* ont été récemment utilisés (trachée, poumon) (Hardy, Coalson et al. 2009, Di Teodoro, Marruchella et al. 2018, Raymond, Turnbull et al. 2018).

La comparaison des génomes des mycoplasmes avec ceux d'autres bactéries pathogènes, n'a pas permis de mettre en évidence la présence de gènes codant pour des facteurs typiques de virulence. Les mycoplasmes ne sont pas dotés de gènes codant pour des cytolytines, des invasines ou des toxines habituellement produites par des micro-organismes pathogènes (Himmelreich, Hilbert et al. 1996, Jaffe, Stange-Thomann et al. 2004, Minion, Lefkowitz et al. 2004, Westberg, Persson et al. 2004). Seul *M. pneumoniae* produit la toxine CARDS (Kannan et Baseman 2006). Aucun homologue de cette toxine n'a été trouvé à ce jour chez les mycoplasmes des ruminants.

D'une manière générale, les mycoplasmes produisent peu de composés directement nocifs pour l'hôte (Browning, Noormohammadi et al. 2014). Lors de mycoplasmoses, deux types d'interactions entre le mycoplasme et son hôte sont observées résultant en la formation d'une infection chronique ou aigüe caractérisée par une réaction inflammatoire et lésionnelle. Les mycoplasmes persistent chez leur hôte grâce à des stratégies d'échappement sophistiquées (modulation des antigènes, forme de vie intracellulaire...) et produisent des composés immunomodulateurs qui désorganisent la réponse immunitaire de l'hôte. Dans ce cas, les signes cliniques et lésionnels observés semblent résulter de la réponse inadaptée de l'hôte face à la présence du mycoplasme (Browning, Noormohammadi et al. 2014). Si cette réponse immunitaire inadaptée s'intensifie, elle entraîne l'apparition de lésions de plus en plus importantes chez l'hôte.

Dans ce contexte, l'utilisation de macrolides, ayant des propriétés anti-inflammatoires (Zimmermann, Ziesenitz et al. 2018), atténue les lésions, même si la souche en question est résistante aux macrolides. Par exemple, aucune différence lésionnelle n'est observée entre des patients porteurs de *M. pneumoniae* résistants ou sensibles aux macrolides suite au traitement antibiotique (Miyashita, Akaike et al. 2013). Ces observations suggèrent que les lésions observées résultent principalement de la réponse du système immunitaire de l'hôte face à la présence des mycoplasmes. Ainsi, les recherches se sont focalisées sur cette réponse et notamment la caractérisation de l'immunoprotéome (Jores, Meens et al. 2009, Párraga-Niño, Colomé-Calls et al. 2012).

Les facteurs de virulence chez les mycoplasmes vont donc être préférentiellement définis comme des facteurs permettant une survie et une persistance optimale ou/et induisant des lésions chez l'hôte (Browning, Noormohammadi et al. 2014). Lors d'une infection bactérienne, une des premières étapes de la pathogénèse consiste en la colonisation d'un hôte sensible par l'agent infectieux. En s'attachant aux tissus de l'hôte, les bactéries vont échapper à l'élimination mécanique (Cf. section 3.1). Nous nous intéresserons aux nombreuses protéines des mycoplasmes possédant des propriétés d'adhésion à des cellules de l'hôte ou à des composés de l'hôte comme le plasminogène, l'héparine ou la fibronectine. Une fois dans l'organisme les bactéries doivent faire face à la réponse immunitaire innée et adaptative et développent donc de nombreuses stratégies d'échappement ou de modulation (Cf. section 3.2). Parmi les stratégies d'échappement décrites chez les mycoplasmes il existe la modulation de la composition de surface, l'interaction et le clivage d'immunoglobulines, l'invasion des cellules, la formation de biofilm ou encore la dégradation des « neutrophils extracellular traps » (ou NETs). D'autres composants produits par les mycoplasmes peuvent participer à la modulation de la réponse immunitaire comme les polysaccharides ou les lipoprotéines. Les mycoplasmes ont également un pouvoir cytotoxique, deux toxines ont été décrites chez deux espèces et d'autres composants cytotoxiques sont également décrits chez ces bactéries comme le peroxyde d'hydrogène ou le sulfure d'hydrogène (Cf. section 3.3).

Dans la suite de cette introduction, nous nous intéresserons donc aux facteurs de virulence décrits pour les mycoplasmes et qui peuvent être répartis en 3 catégories : 1) les molécules participant à l'adhésion, 2) les molécules participant à l'échappement et la modulation du système immunitaire ainsi que 3) les molécules cytotoxiques (Browning, Noormohammadi et al. 2014). Pour plus d'exhaustivité, les facteurs de virulence des mycoplasmes des ruminants seront comparés à ceux retrouvés chez d'autres mycoplasmes largement étudiés tels que *M. pneumoniae*, *M. gallisepticum* ou *M. hyopneumoniae* pathogènes respectivement de l'homme, des oiseaux et des suidés.

3.1. Adhésion :

Comme pour d'autres bactéries, une première étape d'adhésion est nécessaire à l'entrée des mycoplasmes dans les tissus plus profonds (Razin et Jacobs 1992, Rosengarten, Citti et al. 2000). Au cours des infections respiratoires, cette étape d'adhésion est essentielle pour échapper aux systèmes de drainage muco-ciliaire qui éliminent l'agent pathogène hors de l'organisme. L'adhésion est un processus multifactoriel impliquant à la fois des protéines bactériennes et des récepteurs de l'hôte (Rottem 2003, Reolon, Martello et al. 2014). L'interaction entre les composés des mycoplasmes et ceux de l'hôte n'est pas encore totalement décrite mais de nombreuses protéines de type adhésines ont été identifiées à la surface des mycoplasmes, leur(s) récepteur(s) chez l'hôte n'est (ne sont) pas encore caractérisé(s). L'utilisation de composés compétiteurs, le clivage de surface (shaving) ou encore l'utilisation de mutants montrent l'importance de certaines protéines de surface dans l'étape d'adhésion (Zielinski, Young et al. 1990, Zhang, Young et al. 1994, Indikova, Much et al. 2013). Les adhésines produites par les mycoplasmes vont cibler différents types cellulaires de l'hôte. En plus d'interagir avec des cellules de l'hôte, certaines adhésines vont se lier à des composés et des protéines de l'hôte comme le plasminogène et l'héparine.

3.1.1. Adhésion aux cellules de l'hôte

Des protéines de surface capables de se lier aux cellules de l'hôte ont largement été décrites chez *M. pneumoniae*, un mycoplasme responsable de pneumonie atypique chez le jeune enfant. *M. pneumoniae*, est doté d'une organelle terminale appelée « tip » comprenant un réseau complexe de protéines pouvant interagir avec des cellules de l'hôte (Indikova, Much et al. 2013). Parmi les protéines présentes au niveau de l'organelle de *M. pneumoniae*, une protéine participant à l'adhésion a été très étudiée, l'adhésine P1. L'utilisation d'anticorps ciblant cette protéine, inhibe d'au moins 80% l'adhésion de *M. pneumoniae* sur des cellules de trachée d'hamster (Krause et Baseman 1983). Des mutants produisant une protéine P1 non localisée sur l'organelle perdent leur capacité d'adhésion sur des cellules épithéliales de l'hôte ainsi que sur des érythrocytes suggérant l'importance de la localisation adéquate de la P1 au niveau du « tip » (Krause et Balish 2004). De nombreuses protéines accessoires (HMW1, 2 et 3, P30, P65, P40 et P90) sont suspectées de participer à la localisation de la protéine P1 au niveau de l'organelle et donc indirectement à la capacité d'adhésion de *M. pneumoniae*. La mutation d'un gène codant pour une des protéines accessoires inhibe l'adhésion ou modifie la morphologie cellulaire ce qui affecte la présence et l'apparence de l'organelle (Krause et Balish 2001). Comme la protéine P1 est importante pour l'adhésion de *M. pneumoniae*, des protéines homologues ont été recherchées chez d'autres mycoplasmes.

M. gallisepticum, qui est également doté d'une organelle (Seto, Layh-Schmitt et al. 2001), possède une adhésine, GapA, dont le gène possède un pourcentage d'identité de 45% à celui de la protéine P1 (Goh, Gorton et al. 1998). L'utilisation d'anticorps ciblant la protéine GapA diminue la capacité d'adhésion de 64% de *M. gallisepticum* sur des anneaux de trachée de poulet. Il est intéressant de constater que la protéine GapA est absente chez la souche avirulante « R_{high} » dont la capacité d'adhésion est réduite de 80% (Papazisi, Frasca et al. 2002). Pourtant, la complémentation avec la protéine GapA ne permet pas de restaurer la capacité d'adhésion de la souche avirulente suggérant que d'autres protéines, comme c'est le cas chez *M. pneumoniae*, participeraient aussi à l'adhésion ou permettraient la bonne localisation de la protéine (Papazisi, Troy et al. 2000). Le gène de la protéine GapA se trouve dans un opéron avec le gène *crmA*. L'utilisation de mutants délétés des deux protéines, induit une baisse de l'adhésion et une baisse des lésions observées au niveau des sacs d'air pulmonaires. Pour restaurer la capacité d'adhésion, une complémentation des deux protéines simultanément et non l'une ou l'autre séparément est nécessaire (Papazisi, Frasca et al. 2002, Indikova, Much et al. 2013).

Ce type d'organelle qui concentre à un pôle des adhésines, n'a pas été observé chez les mycoplasmes isolés des ruminants. Pour autant, des adhésines ciblant les cellules de l'hôte ont été identifiées chez deux mycoplasmes des ruminants, *Mmm* et *M. bovis* à l'aide de la production de protéines recombinantes d'adhésines potentielles. Une adhésine de *Mmm* a été identifiée à partir d'une souche atténuée, par 468 passages *in vivo* chez le lapin. La comparaison des génomes de la souche atténuée et de la souche parentale a mis en évidence l'absence du gène de la protéine P19 chez la souche atténuée. L'utilisation d'un anticorps a permis de localiser cette protéine dans les fractions membranaires et cytoplasmiques (Zhou, Wang et al. 2016), alors que d'autres données de la littérature lui attribuent une localisation cytoplasmique (Beven, Charenton et al. 2012). Sur cellules bactériennes entières, une adhésion entre cellules embryonnaires pulmonaires bovines (EBL) et protéine recombinante rP19 a été observée et peut être inhibée en présence d'anticorps anti-rP19 (Zhou, Wang et al. 2016). Les observations de microscopie ont cependant montré que l'inhibition de l'adhésion de cellules bactériennes entières en présence de l'anticorps anti-rP19 n'est pas totale, suggérant que cette protéine doit être une des adhésines de *Mmm* parmi d'autres qu'il reste à caractériser.

Chez un autre mycoplasme des ruminants, *M. bovis*, des adhésines ont également été caractérisées. Il s'agit des Vsps (Variable surface lipoproteins). Un test de compétition utilisant des fragments de ces lipoprotéines a permis d'inhiber partiellement l'adhésion de *M. bovis* à des cellules EBL (Sachse, Helbig et al. 2000).

Une lipoprotéine P27 de *M. bovis* semble pouvoir interagir avec des cellules de l'hôte puisqu'une protéine recombinante rP27 est observée à la surface de cellules EBL et que l'adhésion de *M. bovis* diminue en présence d'un anticorps ciblant la P27 (Chen, Huang et al. 2018).

M. bovis, produit également une protéine NADH-oxydase (NOX) impliquée, entre autres, dans la régulation métabolique et la réponse au stress (Zheng, Ren et al. 2017). Une étude s'est focalisée sur cette protéine car d'une part elle est fortement conservée et d'autre part, une protéine homologue chez *Streptococcus pneumoniae* présente une activité d'adhésion cellulaire, en plus de son activité enzymatique (Muchnik, Adawi et al. 2013). Il s'agit d'une protéine de type « moonlight ». Ces protéines sont fréquemment rencontrées chez les mycoplasmes. Elles sont définies comme des protéines ayant plusieurs fonctions (biochemical moonlighting) ou agissant à différentes localisations (geographical moonlighting) (Henderson et Martin 2011). La production d'une protéine recombinante (rNOX) a permis de tester la capacité d'adhésion, de localiser et de produire des anticorps de la protéine NOX. L'adhésion de rNOX sur des cellules EBL a été confirmée par microscopie confocale. Des tests de compétition par système ELISA ont montré que les extraits des protéines cytoplasmiques et membranaires des EBL adhèrent à la protéine recombinante rNOX et que l'adhésion est inhibée en fonction de la quantité d'anticorps ajoutée. La protéine rNOX est une enzyme active localisée dans le cytoplasme et la fraction membranaire et non retrouvée dans le surnageant de culture. Bien qu'elle soit présente dans la fraction membranaire, aucune donnée ne prouve son exposition du côté extracellulaire. Des tests de compétition utilisant des cellules entières de *M. bovis* ont donc dû être utilisés. Ils confirment que l'ajout de protéines recombinantes ou d'anticorps inhibe la capacité d'adhésion de la cellule bactérienne entière sur cellules EBL (Zhao, Zhang et al. 2017). La protéine NOX semble donc, comme chez son homologue *S. pneumoniae*, être une protéine dotée à la fois d'une activité enzymatique mais également d'une activité d'adhésion aux cellules EBL. L'inhibition partielle de l'adhésion de *M. bovis* par l'utilisation d'anticorps suggère que d'autres protéines participent à l'adhésion (ex : les Vsps).

Un autre exemple de caractérisation d'adhésine de *M. bovis* concerne l'enzyme « Methylenetetrahydrofolate-tRNA-(uracil-5-)-methyltransferase » appelée également TrmFO. Une des activités de la protéine TrmFO est de se lier à la flavine pour induire la formation de 5-méthyluridine sur les ARNt (Urbonavicius, Skouloubris et al. 2005). Suite à une étude quantitative des protéines produites par une souche atténuée après 150 passages de *M. bovis*, la protéine TrmFO s'est avérée être moins produite par rapport à la souche parentale. L'adhésion d'une protéine recombinante rTrmFO sur cellules EBL est observée par microscopie confocale et est inhibée par l'ajout d'anticorps spécifiques. La capacité d'adhésion de cellules bactériennes entières de *M. bovis* sur cellules EBL est également inhibée en présence d'anticorps (Guo, Zhu et al. 2017). Comme pour la protéine NOX l'inhibition de l'adhésion n'est pas totale, confirmant que l'adhésion de *M. bovis* est dépendante de nombreuses protéines. En plus de leur activité sur des cellules bovines EBL, les protéines recombinantes rTrmFO et rNOX se lient à la fibronectine, un composé de la matrice extracellulaire.

3.1.2. Adhésion aux composés extracellulaires

La matrice extracellulaire est une couche protectrice présente à la surface cellulaire qui est majoritairement composée de protéines, de glycoprotéines et de glycoaminoglycanes. Cette matrice est spécifique à chaque tissu et sa composition est variable dans le temps. Parmi les protéines présentes à la surface des mycoplasmes, certaines vont interagir avec les composés de la matrice extracellulaire comme l'héparine, un glycoaminoglycane ayant des propriétés anticoagulantes ou la fibronectine entourant les cellules de l'hôte. D'autres protéines vont interagir avec le plasminogène afin de l'immobiliser ce qui peut modifier son activation en plasmine. Le plasminogène est une glycoprotéine de 92kDa clivée en plasmine en présence de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPa) ou de l'activateur de plasminogène de type urokinase (uPa). Une fois activée, la plasmine est une sérine protéase dégradant les réseaux de fibrine et certains constituants de la matrice extracellulaire (Ayon-Nunez, Fragoso et al. 2018, Nguyen, Rottgerding et al. 2018). Lorsqu'il est immobilisé à la surface bactérienne par des mécanismes d'adhésion, le plasminogène activé en plasmine pourrait être protégé de ses inhibiteurs (Figure 5) (Syrovets, Lunov et al. 2012). Ce type d'interaction avec des composés extracellulaires a été largement décrit chez un mycoplasme des suidés *M. hyopneumoniae* (Seymour, Jenkins et al. 2012, Robinson, Buchtmann et al. 2013, Jarocki, Santos et al. 2015).

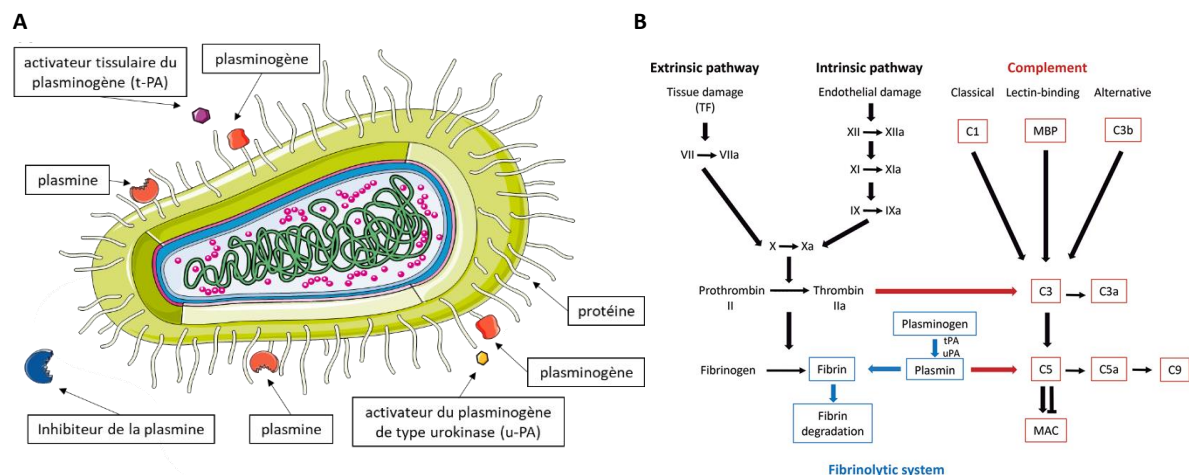


Figure 5: **Schématisation du détournement du plasminogène.** A : Adhésion et immobilisation du plasminogène à la surface bactérienne qui peut être activé en plasmine en présence de ces activateurs. A la surface, la plasmine pourrait être protégée de ces inhibiteurs. B : Action de la plasmine sur le système fibrinolytique et sur la voie du complément (d'après (Ayon-Nunez, Frago et al. 2018))

M. hyopneumoniae sécrète à sa surface deux adhésines P102 et P97, dont les gènes *Mhp182* et *Mhp183* sont en opéron (Hsu et Minion 1998). La P97 est une adhésine se liant aux cils de l'épithélium respiratoire porcin tandis que l'autre est une adhésine se liant au plasminogène et à une glycoprotéine de la matrice extracellulaire, la fibronectine (Zhang, Young et al. 1995, Djordjevic, Cordwell et al. 2004, Seymour, Jenkins et al. 2012). Ces protéines sont clivées à de multiples sites générant une famille de peptides dotés pour certains d'activité d'adhésion tout en participant à la modification de l'architecture de surface du mycoplasme (Djordjevic, Cordwell et al. 2004). La protéine P102 est notamment clivée une fois, ce qui génère deux protéines, P60 et P42. L'utilisation de protéines recombinantes et d'anticorps a permis de démontrer que la protéine p102 ainsi que ces deux fragments sont localisés à la surface. Le mécanisme d'interaction entre les produits de clivage et la membrane n'est pour le moment pas connu. La protéine rP102 et le fragment rP42 ont la capacité de se lier au plasminogène qui est activé en plasmine uniquement en présence de l'activateur tissulaire du plasminogène. De plus, la protéine rP102 et, en moindre mesure, la protéine rP42 ont la capacité de se lier à la fibronectine (Seymour, Jenkins et al. 2012). De nombreux gènes paralogues aux gènes *Mhp182* et *Mhp183* sont détectés dans le génome de *M. hyopneumoniae* (Minion, Lefkowitz et al. 2004) et pourraient également être des adhésines.

De nombreuses études ont donc été menées sur ces gènes paralogues et les protéines associées. La majorité de ces recherches ont employé une stratégie d'étude similaire consistant en la caractérisation des zones de clivages post-traductionnelles et la production de protéines recombinantes pour plusieurs fragments consécutifs.

La capacité d'adhésion des fragments recombinés à l'héparine, la fibronectine, au plasminogène a été évaluée grâce à des tests d'adhésion/compétition. Ces recherches montrent que ces protéines, sécrétées par un mécanisme inconnu à la surface ainsi que les fragments issus d'évènements de clivage endoprotéolytiques ont des propriétés d'adhésion à plusieurs composés extracellulaires, qui sont résumées dans le Tableau 4. Cette fonction d'adhésion aux composés de l'hôte doit participer à l'invasion de *M. hyopneumoniae* puisque la plupart de ces adhésines sont produites *in vivo* (Adams, Pitzer et al. 2005).

Tableau 4: Tableau récapitulatif du nombre de clivages et de la capacité d'adhésion des paralogues des adhésines P97 et P102:

	Gène paralogue à		Interaction d'au moins un fragment démontrée avec			Référence
	Mhp182 (P102)	Mhp183 (P97)	Héparine	Fibronectine	plasminogène	
Mhp108 - P116	oui	non	NR	Oui	Oui	(Seymour, Deutscher et al. 2010)
Mhp271	non	oui	Oui	Oui	NR	(Deutscher, Jenkins et al. 2010)
Mhp384	oui	non	Oui	NR	NR	(Deutscher, Tacchi et al. 2012)
Mhp385	non	oui	Oui	NR	NR	
Mhp493 - P216	non	oui	Oui	NR	NR	(Wilton, Jenkins et al. 2009)
Mhp683 - P135	oui	non	Oui	NR	NR	(Bogema, Scott et al. 2011)
Mhp684 - P146	non	oui	Oui	NR	Oui	(Bogema, Deutscher et al. 2012)

NR : non recherché

Des clivages post traductionnels générant des fragments dotés de propriétés adhésives ont donc été observés pour plusieurs protéines de *M. hyopneumoniae*. Actuellement, la protéase à l'origine de ces évènements de clivage n'est pas identifiée. L'analyse de la séquence de la protéine P216, suggère qu'elle puisse être clivée par une aminopeptidase (Tacchi, Raymond et al. 2014). Or, l'analyse du génome de *M. hyopneumoniae* met en évidence la présence de plusieurs aminopeptidases comme la glutamyl aminopeptidase (MHJ_0125) et la leucine aminopeptidase (MHJ_0461). Leur rôle potentiel dans le clivage des protéines de surface n'est pour le moment pas démontré. En revanche, ces aminopeptidases ont des propriétés d'adhésion.

En plus de leur activité aminopeptidasique, les protéines MHJ_0125 et MHJ_0461 vont, lorsqu'elles sont présentes à la surface, adhérer à des composés de la matrice extracellulaire. Des protéines recombinantes (rMHJ_0125 et rMHJ_0461) et les anticorps correspondants ont permis d'une part, de démontrer que ce sont des aminopeptidases actives et d'autre part, de les identifier à la surface malgré l'absence de peptide signal. Ces deux protéines sont retenues sur colonne à héparine-agarose suggérant qu'elles ont une affinité pour l'héparine. Cette hypothèse est appuyée par le fait que, *in silico*, les deux protéines sont dotées d'un motif qui pourrait interagir avec l'héparine. Les protéines rMHJ_0125 et rMHJ_0461 se lient également au plasminogène purifié et l'activent en plasmine en présence de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA). En l'absence de tPA, il n'y a pas d'activation en plasmine suggérant que les protéines rMHJ_0125 et rMHJ_0461 n'activent pas seules le plasminogène en plasmine (Robinson, Buchtmann et al. 2013, Jarocki, Santos et al. 2015). Donc en plus de leur fonction catalytique, ces protéines pourraient participer à l'adhésion à des composés de l'hôte tels que le plasminogène et l'héparine.

D'autres protéines dotées d'activité de type moonlighting ont été décrites chez un mycoplasme des ruminants, *M. bovis*. Il s'agit de protéines localisées à la fois dans la fraction cytoplasmique et dans la fraction membranaire et dotées d'activités enzymatiques et de liaisons à des composés de la matrice extracellulaire.

La fructose-1,6-biphosphate adolase (FBA) est une enzyme glycolytique produite par *M. bovis*. C'est une lyase catalysant la conversion du fructose-1,6-bisphosphate en glycéraldéhyde-3-phosphate et en dihydroxyacétone phosphate. Chez d'autres micro-organismes, cette enzyme participe à la virulence en se liant notamment au plasminogène (Chaves, Weber et al. 2015). La production d'une protéine recombinante (rFBA) ainsi que d'anticorps (anti-rFBA) ont permis de démontrer que cette enzyme est active et qu'elle est présente dans la fraction cytoplasmique et membranaire de *M. bovis*. Grâce à deux approches, un western blot et un test ELISA, il a été montré que la protéine rFBA se lie au plasminogène de façon dose dépendante (Gao, Bao et al. 2018). Le mécanisme d'interaction entre le plasminogène, les cellules de l'hôte et la protéine FBA n'est pour le moment pas bien connu et l'activation du plasminogène n'a pas été recherchée.

Une autre protéine, α -enolase, produite par *M. bovis* interagit avec des composés de la matrice extracellulaire (Song, Li et al. 2012). C'est une enzyme glycolytique convertissant le 2-phospho-D-glycérate en phosphoénolpyruvate. Bien que l'activité enzymatique n'ait pas été mesurée, cette protéine pourrait posséder une seconde activité d'adhésion. Chez d'autres micro-organismes, cette protéine peut être localisée à la surface et participer à l'adhérence (Nogueira, Fonseca et al. 2010). L' α -enolase de *M. bovis* ne présente pas de motifs de sécrétion. Pourtant, grâce à la production d'une protéine recombinante (α -enolase) et d'anticorps correspondant (anti- α -enolase), il a été possible de localiser par western blotting la protéine dans la fraction cytoplasmique et membranaire. La protéine recombinante ainsi que des fractions membranaires de *M. bovis* se lient sur test ELISA au plasminogène et cette adhésion est inhibée en présence d'anti- α -enolase. Lorsque toutes les protéines extraites par sonication sont testées pour leur capacité d'adhésion au plasminogène par approche ELISA, l'adhésion est plus importante pour la fraction totale que pour la protéine recombinante α -enolase seule (Song, Li et al. 2012). Cela suggère que d'autres adhésines interagissent avec le plasminogène qu'il reste à rechercher chez *M. bovis*, comme cela a pu être montré pour la protéine FBA ainsi que d'autres protéines.

Plusieurs activités sont attribuées au plasminogène activé en plasmine et immobilisé à la surface bactérienne. Celui-ci pourrait participer à l'inflammation en modifiant les voies de signalisation permettant le recrutement de macrophages, monocytes et cellules dendritiques (Syrovets, Lunov et al. 2012, Carmo, Costa et al. 2014). Il pourrait également détourner le système du complément par la dégradation des protéines C3 et C5 (Barthel, Schindler et al. 2012). Outre son rôle dans la coagulation et la dégradation du fibrinogène, la plasmine immobilisée pourrait donc également agir sur la réponse immunitaire innée.

Il sera de nouveau discuté de ces adhésines dans la partie expérimentale s'intéressant aux vésicules extracellulaires (Partie III).

3.2. Interaction avec le système immunitaire: immunomodulation et échappement

Des stratégies d'échappement permettent aux mycoplasmes de ne pas être reconnus et éliminés par divers acteurs de la réponse immunitaire. Ces stratégies consistent en une modification des antigènes de surface et de leur accessibilité ou encore l'évasion face à la reconnaissance par certaines immunoglobulines ou la dégradation des « neutrophils extracellular traps ». Par ailleurs, les mycoplasmes participent à l'exacerbation de la réponse immunitaire de l'hôte en produisant notamment des composés la stimulant ou l'inhibant.

3.2.1. Echappement au système immunitaire :

Cinq mécanismes d'échappement au système immunitaire de l'hôte ont, pour le moment, été décrits chez les mycoplasmes : la variation antigénique ou variation de surface, l'interaction avec les immunoglobulines, l'invasion cellulaire, la formation de biofilm et la dégradation des « neutrophils extracellular traps ».

3.2.1.1. Variation de surface :

Des systèmes permettant de moduler la composition protéique de surface ont été décrits chez les mycoplasmes (Lysnyansky, Sachse et al. 1999). Certaines protéines sont sujettes à des variations de phase ou à des variations antigéniques (également appelées variations de structure) (van der Woude et Baumber 2004, Citti, Nouvel et al. 2010). Ces deux types de variation font appel à deux mécanismes différents. Le premier, la variation de phase, consiste en un mécanisme de switch réversible de type ON/OFF où la protéine est ou non exprimée à la surface. Cette variation va donc impacter la quantité et la proportion de protéines produites. Le second, la variation antigénique ou variation de structure, consiste en la production de protéines dotées d'une taille plus ou moins longue ou de domaines différents, comme sur la Figure 6, générant une mosaïque de surface en constante évolution.

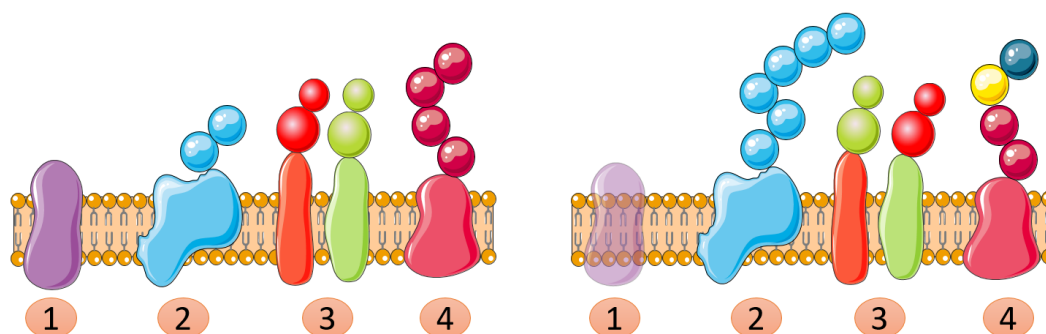


Figure 6: **Schématisation de la variation de surface** adaptés de (Citti, Nouvel et al. 2010) (1 : switch ON/OFF ; 2 : variation de taille ; 3 : brassage de domaines ; 4 : dérivation antigénique)

Ces deux types de variations sont observés chez les mycoplasmes des ruminants. *M. bovis* produit à sa surface des protéines hautement variables appartenant à la famille des Vsps (« variables surface proteins »). Ces protéines ont été mises en évidence suite à une comparaison de profil antigénique sur SDS-PAGE entre 11 isolats de *M. bovis*. Bien que les profils antigéniques des différents isolats étaient plutôt similaires, certaines protéines présentaient une variabilité de leur profil et ont donc été plus finement étudiées. Ces protéines hautement variables sont des lipoprotéines fortement immunogéniques présentes à la surface et dont l'hétérogénéité est indépendante de l'origine géographique de l'isolat ou des signes cliniques associés (Rosengarten, Behrens et al. 1994). Trois membres de cette famille ont pu être analysés plus en détail, VspA, VspB et VspC, variant chacun par leur taille à haute fréquence (Behrens, Heller et al. 1994) grâce à des événements de recombinaison (Lysnyansky, Sachse et al. 1999). En plus de leur variation antigénique, ces protéines présentent une variation de phase (Behrens, Heller et al. 1994). Toutes les Vsps ne sont pas produites en même temps, seules deux Vsps sont produites à la fois (Lysnyansky, Sachse et al. 1999). Ces lipoprotéines sont produites *in vivo* car lors d'infections expérimentales de veaux par injection de *M. bovis* dans les voies respiratoires, plusieurs anticorps ciblant des vsps différentes ont permis de les détecter sur le site d'infection (Buchenau, Poumarat et al. 2010). De par leur variation elles pourraient favoriser l'échappement face à la réponse immunitaire de l'hôte.

Des lipoprotéines variables de surface sont également décrites chez d'autres espèces isolées chez les ruminants. *M. agalactiae*, qui est une espèce proche de *M. bovis*, produit aussi des lipoprotéines immunodominantes appartenant à la famille des Vpmas (variable proteins of *M. agalactiae*) (Glew, Papazisi et al. 2000). Ces lipoprotéines permettent une hyper-variabilité de surface grâce à des réarrangements génétiques entre les gènes vpma (Nouvel, Marenda et al. 2009). Comme pour *M. bovis*, en plus de participer à l'hyper-variabilité de surface, ces lipoprotéines ont des propriétés d'adhésion *in vivo* (Hegde, Zimmermann et al. 2018).

Le rôle de ces lipoprotéines dans la pathogénicité n'est pas totalement connu mais des études suggèrent que la variation de phase influence la survie et la persistance *in vivo* (Chopra-Dewasthaly, Baumgartner et al. 2012, Chopra-Dewasthaly, Spargser et al. 2017). De plus, ces lipoprotéines sont identifiées et modulées *in vivo* avec des profils variant d'un animal infecté à un autre et au sein d'un même animal (Baranowski, Bergonier et al. 2014).

Chez *Mmm*, la lipoprotéine Vmm, est sous l'influence d'une variation de phase par ajout ou délétion de di-nucléotides dans la région promotrice ce qui a pour conséquence de modifier le site de reconnaissance du facteur sigma et donc d'initier ou non la transcription et l'expression de la protéine. Des gènes ressemblant au gène *vmm* ont été retrouvés chez d'autres espèces (*Mcc*, *M. leachii* et *Mccp* mais pas chez *Mmc*, *M. putrefaciens*, *M. cottewii* et *M. yeatsii* (Persson, Jacobsson et al. 2002).

En plus de la lipoprotéine Vmm, *Mmm* produit ou non à sa surface une perméase du système phosphoenol pyruvate : glucose phosphotransférase (PtsG) reconnue par l'anticorps 3F3. En fonction de la souche, la fréquence de variation de phase se déroule à haute ou basse fréquence et résulte d'une substitution d'une base G en A en position 622 de la région codante. Cette substitution génère un codon STOP et donc la production d'une protéine tronquée non reconnue par l'anticorps 3F3 (Gaurivaud, Persson et al. 2004). La protéine PtsG est un antigène fortement reconnu par le système immunitaire et notamment les lymphocytes T-helper (Totte, Mather et al. 2010). L'absence de cet antigène immuno-dominant pourrait donc participer à l'échappement de la reconnaissance du système immunitaire notamment face aux composés de la mémoire immunitaire. Comme ce n'est pas le seul antigène immuno-dominant (il y a également la lipoprotéine LppA), des recherches complémentaires sont nécessaires afin de déterminer son rôle dans la reconnaissance par le système immunitaire et de savoir si l'absence de la protéine PtsG facilite l'échappement du mycoplasme.

Si des variations de phase et antigénique des protéines de surface sont classiquement associées aux protéines, ces phénomènes ont aussi été mis en évidence pour les polysaccharides présents à la surface des mycoplasmes. *Mmm* produit un polysaccharide, le galactane ($\beta(1\rightarrow6)$ galactofuranose), soit sous forme de polysaccharide capsulaire (CPS) soit sous forme d'exopolysaccharide (EPS) (Bertin, Pau-Roblot et al. 2013). Alors que la composition et la structure des CPS sont connues depuis les années 60, celles des EPS ont longtemps été difficiles à étudier du fait de la présence de contaminants polysaccharidiques dans les milieux de culture riches, classiquement utilisés pour la culture des mycoplasmes (Hudson, Buttery et al. 1967). L'utilisation, en 2013, d'un milieu chimiquement défini a permis la purification des EPS et de démontrer que ces EPS ont la même composition et structure que les CPS (Bertin, Pau-Roblot et al. 2013). La production de polysaccharides sous forme de CPS ou d'EPS est corrélée à la présence ou non de la perméase ptsG reconnue par l'anticorps 3F3, dont la variation de phase vient d'être décrite.

Ainsi, la variation de localisation du galactane est une variation réversible. Les variants dotés de la perméase complète (3F3+) sont nommés variants translucides (TR) car ils forment sur milieu solide des colonies translucides. Ils ne produisent pas de capsule (CPS) mais du galactane extracellulaire (EPS). Tandis que les variants dotés de la perméase tronquée (3F3-) sont nommés variants opaques, donnent des colonies opaques et produisent une capsule mais pas d'EPS. Ces différences phénotypiques vont permettre à chacun des variants d'avoir à un moment donné et dans certaines conditions, une meilleure survie chez l'hôte. Le variant capsulé induit une plus longue bactériémie sur modèle murin et est plus résistant face à l'activité bactéricide du complément. Le variant translucide, quant à lui, a une meilleure capacité d'adhésion sur des surfaces inertes et il est plus résistant face à un stress oxydant (Gaurivaud, Lakhdar et al. 2014). L'utilisation d'un vaccin constitué de polysaccharide capsulaire de *Mmm* a permis d'observer une réduction de 57% des pathologies après inoculation de l'agent de la PPCB suggérant que ce vaccin induise une protection partielle des animaux (Mwirigi, Nkando et al. 2016).

Mmm n'est pas la seule espèce à produire des polysaccharides. L'espèce *Mmc* produit également du galactane *in vitro* (Bertin, Pau-Roblot et al. 2015). Une récente étude menée sur *Mmc* suggère qu'un mutant dépourvu de sa capsule de galactane n'induit pas de lésion chez l'hôte *in vivo* tandis que la souche parentale induit des lésions (Jores, Schieck et al. 2018). Ces données encouragent les recherches sur le rôle *in vivo* des polysaccharides qui sont produits chez de nombreuses espèces pathogènes et notamment des mycoplasmes des ruminants.

Chez un autre mycoplasme, *M. agalactiae*, la production d'une capsule constituée de $\beta(1\rightarrow6)$ glucopyranose ($\beta(1\rightarrow6)$ glucane) est associée à une augmentation de la susceptibilité de la bactérie en présence de sérum en raison de la reconnaissance du polysaccharide capsulaire par le système du complément. Chez cette espèce le CPS est synthétisé par l'enzyme GsmA (glycan synthase of mollicutes in *M. agalactiae*) dont le gène est sujet à une variation de phase à haute fréquence en fonction de la longueur de la répétition de base guanine dans sa séquence. Lors de l'incubation de culture de *M. agalactiae* avec du sérum, une plus grande quantité de variant non capsulé est observée tandis que lors d'une incubation avec du sérum inactivé, une plus grande proportion du variant capsulé est observée. Cela suggère que le glucane ne protège pas mais augmente plutôt la sensibilité de *M. agalactiae* *in vitro*, qui, en fonction de la production ou non d'une capsule, peut échapper au complément (Gaurivaud, Baranowski et al. 2016).

Ces protéines capables de modifier l'architecture de surface seront notamment étudiées dans la partie expérimentale s'intéressant aux vésicules extracellulaires (Partie III).

3.2.1.2. Interaction avec des immunoglobulines

Des interactions entre des protéines mycoplasmiques et des composés du système immunitaire ont été décrites et consistent en la fixation ou le clivage d'immunoglobulines de l'hôte. Chez *M. genitalium*, responsable d'infections uro-génitales chez l'Homme, une protéine « M » se lie aux Immunoglobulines G avec une forte affinité (Grover, Zhu et al. 2014). La protéine M a été initialement mise en évidence lors d'une étude s'intéressant aux antigènes mycoplasmiques reconnus par des anticorps plasmatiques. Sur les extraits protéiques totaux de *M. genitalium*, une seule zone d'affinité sur western blot, induisant une forte réaction entre les anticorps plasmatiques et les protéines de *M. genitalium* est observée pour une protéine de 50kDa. Cette protéine a donc été purifiée pour être caractérisée plus finement, une protéine recombinante et un mutant ont été produits. L'analyse de l'extrait protéique d'une souche mutée pour la protéine M montre que les anticorps ne se lient plus à une protéine de 50 kDa suggérant que la protéine M soit la molécule reconnue par les anticorps plasmatiques. Cette protéine nommée protéine M correspond à la protéine MG281 de *M. genitalium*. Elle présente une forte affinité pour de nombreuses immunoglobulines G (IgG) produites chez l'Homme, la souris, le rat, le lapin ou les bovins. La protéine M a la capacité d'inhiber l'interaction entre des antigènes (virus influenza, VIH, virus Ebola) et les immunosérums correspondants en empêchant la liaison initiale mais sans déstabiliser les liaisons préexistantes. La protéine M est dotée d'un domaine transmembranaire et d'un large domaine C-terminal (C-term) de 360 résidus se liant principalement à une portion conservée des régions variables des chaînes κ et λ des IgG. C'est ce domaine C-term qui bloque l'entrée d'antigènes lorsque la protéine M est liée à l'anticorps (Grover, Zhu et al. 2014). Des homologies de séquences ont été trouvées pour le gène codant la protéine M chez *M. iowae*, *M. gallisepticum* et *M. pneumoniae* mais aucune homologie n'est observée chez les mycoplasmes des ruminants.

Pourtant Arfi et ses collaborateurs ont identifié une protéine chez *Mmc* qui présente une forte similarité structurale avec la protéine M, malgré une faible conservation de la séquence des gènes correspondants. La protéine en question fait partie d'un système interagissant avec les IgG, nommé MIB-MIP (Arfi, Minder et al. 2016). Ce système est composé d'une protéine MIB se fixant à l'anticorps ainsi que d'une protéase MIP interagissant avec le complexe MIB-IgG afin de cliver l'IgG. La protéine MIB est une protéine de 83kDa se liant à la région variable d'immunoglobulines G issues de divers mammifères (caprins, ovins, bovins, humains etc..). La protéine MIP, quant à elle, est une protéase de 97kDa clivant le domaine variable de la chaîne lourde des IgG, ce qui génère un fragment d'environ 44kDa. L'activité protéolytique s'effectue séquentiellement. La peptidase MIP est incapable de cliver directement l'IgG : une adhésion préalable de la protéine MIB à l'IgG est indispensable au clivage.

In silico, la prédiction de la structure de la protéase MIP indique que c'est une sérine protéase bien qu'elle ne soit pas inhibée par les inhibiteurs classiques de sérine protéases tels que le fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF). Ce système de clivage a été initialement démontré chez *Mmc* mais des gènes homologues ont été retrouvés en une ou plusieurs copies chez les autres membres du cluster *M. mycoides* mais également chez des espèces plus éloignées tels que *M. bovis* et *M. agalactiae* (Arfi, Minder et al. 2016). Des recherches récentes suggèrent que le système MIB-MIP est actif *in vivo* puisqu'un fragment de 44kDa révélé par un anticorps anti-IgG caprin est observé après une infection à *Mmc* (Jores, Ma et al. 2019). Ce fragment n'est plus présent lors d'une infection utilisant un mutant pour plusieurs protéines dont celles du système MIB-MIP. Comme ce mutant a perdu d'autres gènes en plus de ceux du système MIB-MIP, des recherches complémentaires sont nécessaires pour s'assurer que les autres gènes délétés ne participent pas au phénotype observé.

Un autre système de clivage des immunoglobulines a été mis en évidence chez les mycoplasmes aviaires impliquant la protéase CysP. C'est une protéase à cystéine (inhibée par l'iodoacétamide) de 65kDa produite à la surface membranaire par *M. gallisepticum* et qui cible les IgG en séparant les parties Fab et Fc. Cette protéase a également été mise en évidence chez *M. synoviae* mais reste spécifique des mycoplasmes aviaires (Cizelj, Bercic et al. 2011).

Des protéines ciblant des IgG et perturbant leur affinité pour leur antigène ou des protéases les clivant directement ont été identifiées chez différents mycoplasmes isolés d'hôtes différents. Les IgG sont donc une cible de protéines et protéases mycoplasmiques. Pour le moment, les conséquences d'une inhibition de reconnaissance ou d'un clivage d'IgG *in vivo* n'ont pas été clairement démontrées chez les mycoplasmes. Chez d'autres micro-organismes, l'inhibition de la capacité de liaison entre une IgG et son antigène contribue à la persistance bactérienne (Eriksson et Norgren 2003).

Ces protéases de surface qui ciblent des molécules du système immunitaire seront à nouveau rencontrées au cours de la partie expérimentale s'intéressant à l'activité protéasique extracellulaire (Partie II) ainsi que dans la partie III s'intéressant aux vésicules extracellulaires.

3.2.1.3. L'invasion et la persistance dans les cellules de l'hôte.

Des mycoplasmes ont été observés à l'intérieur de cellules de l'hôte. L'invasion cellulaire de *M. agalactiae* a été observée à la fois *in vitro* et *in vivo* dans des cultures cellulaires (HeLa, BEND « Bovine endometrium cell line ») et des coupes tissulaires issues de plusieurs organes (poumons, foie, reins, utérus, articulations) de mouton (Hegde, Spargser et al. 2014). Pour *M. bovis*, l'invasion et la persistance intracellulaire ont été décrites dans des cellules embryonnaires de veau « embryonic calf turbinate cell » (Burki, Gaschen et al. 2015). Une fois dans les cellules embryonnaires de veau, une multiplication intracellulaire de *M. bovis* est observée (Burki, Gaschen et al. 2015). Le mécanisme d'entrée n'est pour le moment pas caractérisé, diverses voies d'entrée potentielles ayant été inhibées sans conséquence sur l'entrée du mycoplasme (Burki, Gaschen et al. 2015). Celui-ci doit dépendre d'une première étape d'adhésion comme pour de nombreux autres micro-organismes (Pizarro-Cerda et Cossart 2006, Whiteley, Meffert et al. 2017) mais cela nécessite encore d'être démontré pour ce mycoplasme. Chez un autre mycoplasme, *Mmm*, des recherches ont permis de confirmer cette hypothèse car l'utilisation d'anticorps issus de sérum immun inhibe la capacité d'entrée de *Mmm* dans les cellules épithéliales bronchiolaires et alvéolaires ainsi que dans les macrophages alvéolaires (Di Teodoro, Marruchella et al. 2018)

Un mécanisme d'entrée décrit à ce jour est celui d'une espèce pathogène des suidés, *M. hyopneumoniae*. Il initie son entrée en s'associant tout d'abord aux cellules épithéliales via l'intégrine de surface $\beta 1$ et la fibronectine. Cette interaction va permettre l'entrée de *M. hyopneumoniae* à l'intérieur de la cellule par le biais d'endosomes à clathrine ou caveoline (Raymond, Turnbull et al. 2018). La forme intracellulaire n'a pour le moment été observée qu'*in vitro* ou dans des coupes tissulaires et nécessite d'autres recherches pour être observée *in vivo*. La persistance, voire la multiplication des mycoplasmes à l'intérieur de cellules de l'hôte pourrait expliquer l'inefficacité relative des traitements antibiotiques alors que les souches restent, en théorie, sensibles.

3.2.1.4. La formation de biofilm

Les biofilms sont des regroupements de cellules bactériennes adhérant à des surfaces biotiques ou abiotiques. En plus des cellules bactériennes, une matrice extracellulaire composée de polymères (ADN, polysaccharides) mais aussi de protéines et de vésicules extracellulaires, constitue le biofilm. Les biofilms sont des structures dynamiques en perpétuel remaniement au sein duquel, les bactéries sont protégées des conditions environnementales hostiles et donc, de la réponse de l'hôte (Singh, Singh et al. 2017). La formation de biofilm a été largement décrite chez les bactéries mais n'a été observée *in vitro* chez les mycoplasmes qu'à partir de 2006 (McAuliffe, Ellis et al. 2006). La présence de biofilms a été initialement détectée *in vitro* par coloration au cristal violet, puis l'utilisation de la microscopie (électronique, confocale) a permis d'observer avec plus de précision leur structure. Leur formation *in vitro* est complexe, dépendante de nombreux paramètres (type de surface d'adhésion, composition du milieu d'incubation, variation intra-espèces), induisant une variabilité des biofilms produits (Chen, Yu et al. 2012, Simmons, Daubenspeck et al. 2013).

Des études *in vitro* ont permis d'observer par microscopie la formation de biofilm chez *M. pulmonis* (Simmons et Dybvig 2007), *M. pneumoniae* (Kornspan, Tarshis et al. 2011, Simmons, Daubenspeck et al. 2013), *M. gallisepticum* (Chen, Yu et al. 2012), *M. bovis* (McAuliffe, Ellis et al. 2006, Chen, Hao et al. 2018) et *M. hyopneumoniae* (Raymond, Jenkins et al. 2018) et de mieux comprendre certaines étapes de la formation de ces structures. Il a été démontré qu'une étape d'adhésion est essentielle à la formation de biofilm. Par exemple, chez *M. pneumoniae*, cette étape d'adhésion utilise la protéine P1 de l'organelle (paragraphe 3.1.1) (Kornspan, Tarshis et al. 2011). De plus la présence d'ADN extracellulaire ne semble essentielle qu'à la formation de biofilm sur surface abiotique (Raymond, Jenkins et al. 2018). Enfin, il a été observé que certaines cellules présentes à l'intérieur du biofilm laissent passer des marqueurs qui ne traversent normalement pas les membranes suggérant que ces cellules ont des membranes perméables ou sont lysées.

La résistance des mycoplasmes, présents au sein du biofilm, vis-à-vis du complément et des peptides antimicrobiens a été évaluée en utilisant comme modèle *M. pulmonis* (Simmons et Dybvig 2007). Des biofilms intacts et des biofilms volontairement dispersés ont été exposés à du sérum (complément) ou à de la gramicidine (peptide antimicrobien). Le sérum et la gramicidine ont éliminé 40% des cellules présentes dans le biofilm et 75% des cellules dispersées suggérant que les mycoplasmes sous forme de biofilm ont une meilleure résistance. Par microscopie à fluorescence, il a été observé que les mycoplasmes présents au cœur du biofilm sont les moins touchés par le complément et la gramicidine. La formation de biofilm permettrait donc d'échapper au système du complément de l'hôte ce qui a été démontré, pour le moment, *in vitro*.

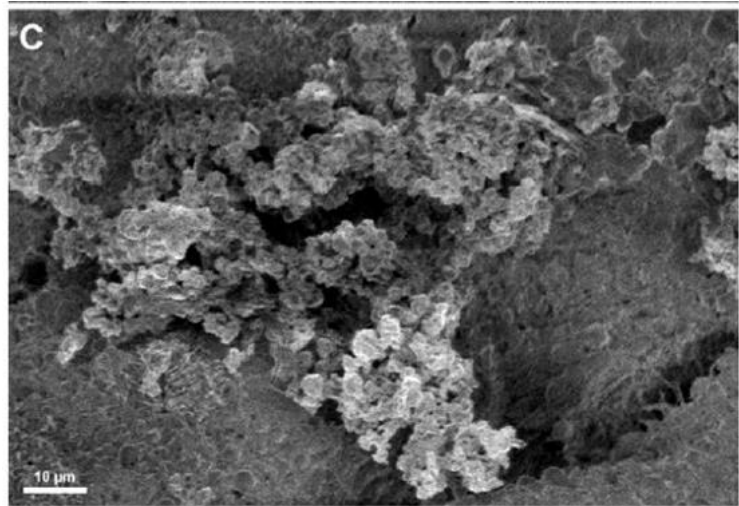


Figure 7 **Observation de biofilm** formé *in vivo* sur épithélium porcin (grossissement 2000×) (Raymond, Jenkins et al. 2018)

Des biofilms de *M. hyopneumoniae* ont été observés à la fois *in vitro* par microscopie confocale et électronique sur de l'épithélium porcin mais également *in vivo* à partir de coupes de trachée de porcs infectés expérimentalement (Figure 7) (Raymond, Jenkins et al. 2018). Le rôle *in vivo* de ces biofilms dans la virulence reste à déterminer.

3.2.1.5. Interaction avec les NET

Les « Neutrophil extracellular traps » (NET) sont des réseaux constitués de composants nucléaires et granulaires ou cytoplasmiques libérés par les neutrophiles dans le milieu extracellulaire. Ces réseaux vont servir de barrière et piéger les bactéries afin de limiter leur propagation. Des nucléases bactériennes, libérées dans le milieu extérieur, pourraient participer à l'échappement face à ce mécanisme de défense non spécifique de l'hôte.

La formation de NET a été observée sur des prélèvements de glandes mammaires d'ovins souffrant d'agalactie contagieuse à *M. agalactiae* (Cacciotto, Cubeddu et al. 2016). *In vitro*, *M. agalactiae* et plus particulièrement sa fraction liposoluble, après une extraction au Triton X114, induit la formation de NET par les neutrophiles. L'utilisation d'un mélange de lipopeptides synthétiques ou de lipopeptides utilisés séparément stimule de la même manière la formation de NET suggérant qu'elle doit être indépendante de la séquence du lipopeptide. La stimulation de la formation de NET par les lipopeptides utilise la voie de signalisation TLR2 des neutrophiles comme l'a démontré l'utilisation d'anticorps ciblant ce récepteur. Les NETs formés par *M. agalactiae* ont cependant un aspect plus déstructuré que ceux observés avec l'emploi d'un activateur de NET (ex : phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)).

Une activité nucléasique du mycoplasme pourrait participer à ce constat par la dégradation des NETs, qui est donc suspectée dans cette étude, mais non démontrée (Cacciotto, Cubeddu et al. 2016).

En revanche, chez un autre mycoplasme des bovins, *M. bovis*, une activité DNAsique a été démontrée. *M. bovis* produit une nucléase, MBOV_RS02825, à sa surface et la sécrète dans le milieu extracellulaire. Dans cette étude, *M. bovis* n'a pas la capacité d'induire la production de NET mais l'ADN issu de NETs stimulés par le PMA peut être digéré par la protéine recombinante rMbovNase (Zhang, Zhao et al. 2016). De plus, cette nucléase a un impact sur la réponse immunitaire puisqu'elle induit l'apoptose de macrophages bovins en modulant la production de plusieurs protéines associées à l'apoptose (inhibition de Bcl-2, augmentation de Bax).

3.2.2. Immuno-modulation :

Des composés produits par les mycoplasmes, comme les polysaccharides et les lipoprotéines, participent à la modulation de la réponse immunitaire.

3.2.2.1. Les polysaccharides en tant que composés immuno-modulateurs

Mmm produit du galactane (section 3.2.1.1) sous forme de CPS qui protège le mycoplasme de l'activité bactéricide du complément (Gaurivaud, Lakhdar et al. 2014). Mais *Mmm* produit également du galactane sous forme d'EPS qui a une activité anti-inflammatoire (Totte, Puech et al. 2015). *In vitro*, le galactane induit la production de la cytokine IL-10, dotée de propriété anti-inflammatoire, par les macrophages. De plus, il n'y a pas d'augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires (Totte, Puech et al. 2015). L'analyse transcriptomique réalisée *ex vivo* à partir de sang d'animaux infectés par *Mmm* n'a par ailleurs pas permis de mesurer de molécules pro-inflammatoires ce qui pourrait être en lien avec la production de galactane circulant (Rodrigues, Holzmuller et al. 2015).

M. agalactiae produit également un polysaccharide capsulaire, le $\beta(1\rightarrow6)$ glucan (section 3.2.1.1). Comme le $\beta(1\rightarrow6)$ glucan est un polysaccharide abondant de la paroi des champignons (Camilli, Tabouret et al. 2018), des anticorps anti- $\beta(1\rightarrow6)$ glucan sont détectables dans la circulation sanguine des chèvres même en l'absence d'une infection par *M. agalactiae* (Gaurivaud, Baranowski et al. 2016). Chez les champignons ce type de polysaccharide induit la migration de neutrophiles et participe à l'inflammation dans les tissus infectés (Sato, Iwabuchi et al. 2006, Kottom, Hebrink et al. 2015). Les variants de *M. agalactiae* produisant du glucane sont plus sensibles à l'activité bactéricide du complément que ceux n'en produisant pas (Gaurivaud, Baranowski et al. 2016) mais le rôle de ce CPS dans l'interaction avec l'hôte et le système immunitaire reste à élucider.

3.2.2.2. Les lipoprotéines

Le rôle des lipoprotéines dans la virulence bactérienne a été démontré chez *M. pneumoniae*. Ce mycoplasme produit une « dipalmitoylated lipoprotein » qui participe à l'activation de la voie NF- κ B au travers des récepteurs de type Toll (TLR1, TLR2, et TLR6) (Shimizu, Kida et al. 2005). L'activation du facteur NF- κ B participe à la réponse inflammatoire en favorisant notamment l'expression de gènes nécessaires à l'activation des lymphocytes T. Le rôle de cette activation sur l'induction d'une réponse pro-inflammatoire *in vivo* reste à éclaircir.

Chez les mycoplasmes des ruminants, des études se sont intéressées à plusieurs lipoprotéines et notamment la LppA et LppQ produites par certains membres du cluster *M. mycoides*. Plusieurs protéines dotées d'une structure similaire, nommées LppA, ont été mises en évidence chez *Mmc* (Monnerat, Thiaucourt et al. 1999), *Mmm* (Abdo, Nicolet et al. 1998) et *Mcc* (Monnerat, Thiaucourt et al. 1999¹). Même si les différentes LppA possèdent des structures similaires, les anticorps ciblant chacune d'elles sont spécifiques à la sous-espèce ciblée. En revanche, *Mccp*, ne produit pas la lipoprotéine LppA car un pseudogène est présent à la place du gène (Monnerat, Thiaucourt et al. 1999¹).

Une autre lipoprotéine, lppQ, a été identifiée chez *Mmm*. Cette lipoprotéine membranaire est fortement reconnue par du sérum issu d'animaux infectés (Abdo, Nicolet et al. 2000) ce qui aurait pu en faire une cible de choix pour l'élaboration d'un vaccin. L'efficacité d'un vaccin constitué d'une protéine recombinante axée sur la partie N-terminale (N-term) de la lipoprotéine lppQ a été évaluée sur des zébus (Mulongo, Frey et al. 2015). Ce vaccin s'est révélé inutilisable car il ne limite pas la réaction inflammatoire et les lésions pulmonaires caractéristiques de la PPCB (Mulongo, Frey et al. 2015). A ce jour, peu d'études démontrent le rôle des lipoprotéines dans la virulence des membres du cluster *M. mycoides*. Seule la protéine LppA de *Mmm* pourrait participer à la modulation de la réponse immunitaire puisque c'est un antigène fortement reconnu par le système immunitaire et notamment les lymphocytes T-helper (Totte, Mather et al. 2010).

3.3. Le pouvoir cytotoxique :

Certains composés vont directement agir sur les cellules de l'hôte et provoquer leur lyse. La production d'une toxine n'a pour le moment été démontrée que chez deux espèces *M. pneumoniae* et *M. penetrans*. En revanche la production de molécules cytotoxiques, comme le peroxyde d'hydrogène, a été observée chez plusieurs mycoplasmes.

3.3.1. La toxine CARDS

M. pneumoniae est la cause d'infections respiratoires et notamment de 40% des CAP (Community acquired pneumonia) chez les enfants (Waites et Talkington 2004, Li, Xue et al. 2019). Ce mycoplasme produit une toxine appelée toxine CARDS (Community Acquired Respiratory Distress Syndrom) (MPN372). Cette protéine a été initialement étudiée car elle présente une homologie avec une sous-unité de la toxine pertussique qui présente une forte affinité pour le surfactant A pulmonaire (Hardy, Coalson et al. 2009). Pour mieux caractériser la toxine, une protéine recombinante a été produite (rCARDS). Il a été démontré que la toxine CARDS est dotée d'une activité ADP-ribosyltransférase (ART), favorisée par la présence de dithiothréitol (DTT) *in vitro*. Sur culture cellulaire, l'exposition à la protéine recombinante rCARDS induit une vacuolisation et une perte de l'intégrité du tissu. Des anneaux de trachée de babouin, conservant leur intégrité 10 jours en culture *in vitro*, présentent une désorganisation du mouvement ciliaire après seulement 24h d'exposition avec la protéine recombinante. La protéine recombinante rCARDS induit également *in vivo* une vacuolisation de cellules de l'épithélium bronchique et favorise l'infiltration de lymphocytes (Hardy, Coalson et al. 2009). De plus, des analyses *in vivo*, sur modèle murin et sur un primate, ont montré que la protéine recombinante rCARDS induit une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires. La toxine CARDS est localisée dans le contenu cytoplasmique et membranaire et plus précisément à la surface du côté extracellulaire (Kannan, Musatovova et al. 2010). En revanche, elle n'est pas libérée dans le milieu extracellulaire (Kannan et Baseman 2006). Pour que la toxine puisse agir sur ces cellules cibles, un contact rapproché entre la bactérie et sa cible est donc nécessaire. L'expression de l'ARNm de la toxine augmente au cours de l'infection cellulaire, elle est plus importante en co-culture avec des cellules de type HeLa qu'en milieu axénique. Cela suggère que le contact avec les cellules cibles influence l'expression du gène de la toxine par un mécanisme non caractérisé à l'heure actuelle (Kannan, Musatovova et al. 2010). La toxine CARDS n'a été identifiée que chez *M. pneumoniae*, aucune homologie n'a été observée au sein des mycoplasmes des ruminants.

3.3.2. Autre toxine, MYPE9110

Chez un autre mycoplasme, mais cette fois-ci, opportuniste humain, *M. penetrans*, une protéine (MYPE9110) présente une homologie de séquence avec la toxine CARDS. Grâce à la production d'une protéine recombinante rMYPE9110, son activité ADP-ribosyltransférase a été démontrée sur culture cellulaire HeLa. L'exposition de cellules HeLa à la protéine rMYPE9110 induit une vacuolisation et une perte de l'intégrité cellulaire et cela est favorisé par la présence de chlorure d'ammonium *in vitro* (Johnson, Kannan et al. 2009). Tout comme pour la toxine CARDS, aucune homologie n'est détectée pour la protéine MYPE9110 chez des mycoplasmes des ruminants.

3.3.3. La production de peroxyde d'hydrogène

La production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), largement décrite chez *Mmm* l'agent de la PPCB, est liée au métabolisme du glycérol. Celui-ci dérive de phospholipides de l'hôte et représente une source de carbone et d'énergie permettant à la bactérie de survivre en l'absence de source de carbone issue du glucose (Blotz et Stulke 2017) mais est également nécessaire à la synthèse des lipoprotéines. Une des voies d'entrée du glycérol dans la cellule mycoplasmaïque utilise les transporteurs de type ABC, gtsA, gtsB et gtsC (Figure 8) (Vilei et Frey 2001). Lors de son entrée le glycérol est phosphorylé en glycerol-3-phosphate qui sera lui-même oxydé en dihydroxyacetone phosphate (DHAP) grâce à l'action d'une l- α -glycerophosphate oxydase (glpO). Lors de ce processus d'oxydation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est formé. Le rôle de la protéine glpO a été démontré à l'aide d'un anticorps anti-glpO inhibant la production de peroxyde d'hydrogène (Pilo, Vilei et al. 2005). L'utilisation d'un mutant ne possédant pas les transporteurs gtsA, gtsB et gtsC réduit de 30 fois la production d' H_2O_2 *in vitro* par rapport à la souche parentale (Jores, Ma et al. 2019). Une voie alternative utilisant le facteur glpF est proposée pour appuyer l'entrée du glycérol dans le cytoplasme (Pilo, Vilei et al. 2005). L'effet cytotoxique de l' H_2O_2 sur les cellules de l'hôte et qui induit leur lyse, n'est pas totalement connu. L' H_2O_2 pourrait agir directement sur l'hôte par la dégradation des tissus ou indirectement en activant des gènes liés à la réaction inflammatoire et notamment la voie NF- κ B. Enfin, la dernière voie d'action de l' H_2O_2 pourrait consister en une réaction de Fenton participant, entre autres, à la formation de radical hydroxyle (Pilo, Vilei et al. 2005). L'expression de l'enzyme glpO a été confirmée *in vivo* chez *Mccp* grâce à son identification dans du liquide pleural d'animaux infectés (Liljander, Sacchini et al. 2019).

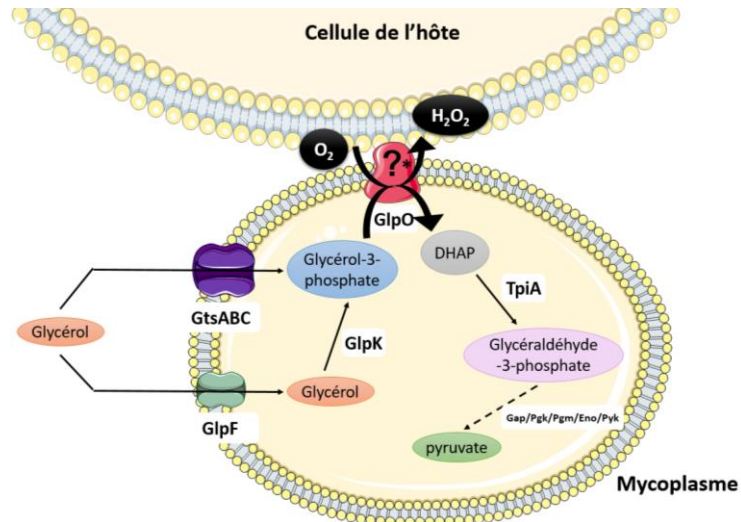


Figure 8 : **Représentation schématique de la voie de production de peroxyde d'hydrogène chez les mycoplasmes** inspirée de (Pilo, Vilei et al. 2005) et (Blotz et Stulke 2017) (DHAP: dihydroxyacetone phosphate ; TpiA: Triphosphate isomérase ; GlpF: facilitateur du glycérol ; GtsABC: Transporteur ABC du glycérol de forte affinité ; GlpO : Glycérol-3-phosphate oxydase ; GlpK : Glycerol kinase ; Gap: Glyceraldéhyde-3-phosphatase ; Pgk: Phosphoglycérate kinase ; Pgm Phosphoglycérate mutase ; Eno: Phosphopyruvate hydrolase ; Pyk: Pyruvate kinase) ?*: La localisation membranaire de l'enzyme GlpO est en cours de discussion (Schumacher, Nicholson et al. 2019)

Bien que l'effet cytotoxique *in vitro* soit largement démontré, le rôle de cette voie est plus nuancé *in vivo*. La souche de *Mmm*, PG1, produit de l' H_2O_2 *in vitro* bien qu'elle soit avirulente *in vivo* (Pilo, Vilei et al. 2005). Cette nuance est également observée chez *M. gallisepticum* grâce à la production de mutants pour les protéines GlpO, GlpK, et GlpF. Ces mutants sont incapables de produire de l' H_2O_2 et ne sont pas cytotoxiques *in vitro*. En revanche, ils sont virulents lorsqu'ils sont placés dans des trachées de poulet suggérant que la virulence de ces mutants n'est pas totalement liée à la production d' H_2O_2 (Szczepanek, Boccaccio et al. 2014). Enfin, une étude récente suggère que l'enzyme GlpO pourrait être cytoplasmique et non membranaire (Schumacher, Nicholson et al. 2019). Le mécanisme permettant la sortie de l' H_2O_2 devrait ainsi être recherché. Malgré ces nuances sur un lien direct entre métabolisme du glycérol et pathogénicité, ainsi que sur la localisation de la glpO, la production d' H_2O_2 reste à l'heure actuelle un des facteurs cytotoxiques les mieux décrits chez les mycoplasmes des ruminants.

3.3.4. La production de sulfure d'hydrogène

La production d'un autre métabolite, le sulfure d'hydrogène, a été décrite chez *M. pneumoniae*. Une enzyme bifonctionnelle, HapE, est une cystéine desulfurase et desulfhydrase capable de produire de l'alanine, du pyruvate et du sulfure d'hydrogène à partir de la cystéine (Grosshennig, Ischebeck et al. 2016). Elle a une activité hémolytique en présence de cystéine. Sur des cultures cellulaires bronchiques humaines (NHBE), l'ajout d'une protéine recombinante rHapE inhibe la viabilité, la croissance cellulaire et augmente la quantité de cellules bloquées en phase S. De plus, rHapE augmente la production de facteurs anti-inflammatoires telles que les interleukines IL-4 et IL-6 (Li, Xue et al. 2019). Le rôle direct du sulfure d'hydrogène produit par l'enzyme n'a pour le moment pas été évalué. Cette voie n'a été décrite que chez *M. pneumoniae* et n'est pas observée chez d'autres mycoplasmes.

De nombreuses recherches ont donc été menées afin d'identifier des facteurs de virulence impliqués dans la pathogénèse des mycoplasmes. Ces recherches sont complexes puisqu'il n'y a pas de facteurs de virulence évidents et communs à de nombreuses espèces mycoplasmiques pathogènes. Pour certains facteurs de virulence, comme par exemple la production de la toxine CARDS par *M. pneumoniae*, le rôle direct de cette toxine dans la virulence est facilement évaluable car elle induit une toxicité cellulaire qui est produite par une espèce pathogène *in vivo*. En revanche, pour d'autres espèces n'induisant pas de lésions *in vivo* mais produisant des facteurs de virulence agissant *in vitro*, l'importance de ces facteurs dans l'induction de pathologies chez l'hôte est plus discutable. Cela peut être illustré par la production d'une toxine MYPE9110 agissant *in vitro* mais produite par une espèce opportuniste *M. penetrans* ou la production d'H₂O₂ par une souche avirulente *in vivo*, PG1.

De plus, les mycoplasmes produisent de nombreuses protéines dotées d'activités de type moonlighting qui, à première vue, ne semblent pas être impliquées dans la virulence. C'est le cas des nombreuses adhésines, comme par exemple la FBA ou l' α -enolase (section 3.1.2), dont le rôle dans l'adhésion n'a été découvert que récemment grâce à la production de protéines recombinantes. Ces données reflètent les difficultés rencontrées pour la caractérisation de nouveaux facteurs de virulence chez les mycoplasmes.

A l'heure actuelle, la grande majorité des facteurs de virulence identifiés ont un point commun, ils font partie du sécrétome mycoplasmaïque qui sera détaillé ci-après dans la section 4.

4. Le sécrétome des mycoplasmes :

Le sécrétome regroupe les protéines libérées dans le milieu extracellulaire (exoprotéome), les protéines membranaires orientées vers le milieu extracellulaire (surfacoème ou protéome de surface) ainsi que toute la machinerie impliquée dans la sécrétion (Figure 9) (Armengaud, Christie-Oleza et al. 2012). Une schématisation du sécrétome en figure 9 a été proposée par Armengaud et ses collaborateurs.

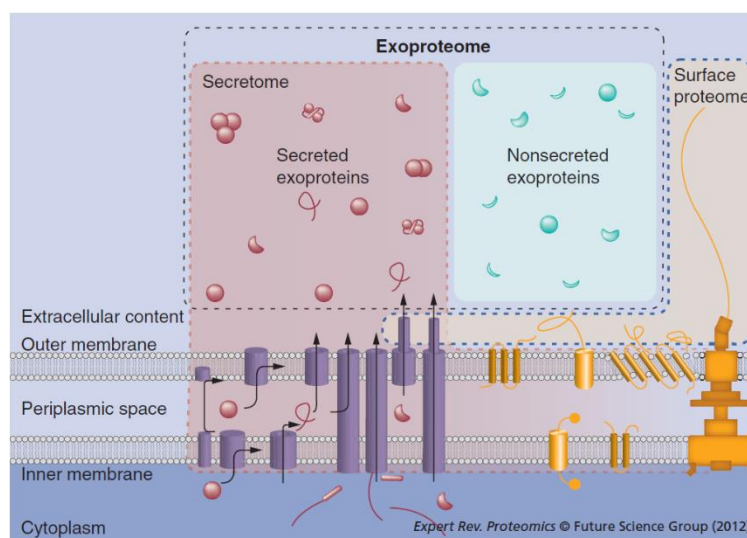


Figure 9: **Le concept de sécrétome chez les Gram -** (d'après (Armengaud, Christie-Oleza et al. 2012)). Le sécrétome regroupe les protéines sécrétées et la machinerie de sécrétion. L'exoprotéome regroupe les exoprotéines sécrétées par une voie de sécrétion classique ainsi que celles libérées dans le milieu extracellulaire par une voie alterne. Le surface-protéome regroupe les protéines accrochées à la membrane externe et orientées vers le milieu extracellulaire.

Ce modèle n'est pas totalement adapté à l'étude des mycoplasmes. Contrairement aux Gram+ et Gram-, les mycoplasmes sont dépourvus de paroi donc leur cytoplasme est séparé du milieu extracellulaire uniquement par une membrane cytoplasmique. Les voies de sécrétion chez ces bactéries sont peu documentées et doivent être adaptées à cette interface mycoplasme-milieu extracellulaire/hôte différente (Figure 10). Dans sa définition couramment admise, le sécrétome est constitué de protéines mais pour l'étude des mycoplasmes, nous proposons d'adapter cette définition et de l'élargir à d'autres composés produits par la bactérie tels que les polysaccharides ou les radicaux oxygénés libres (Figure 10).

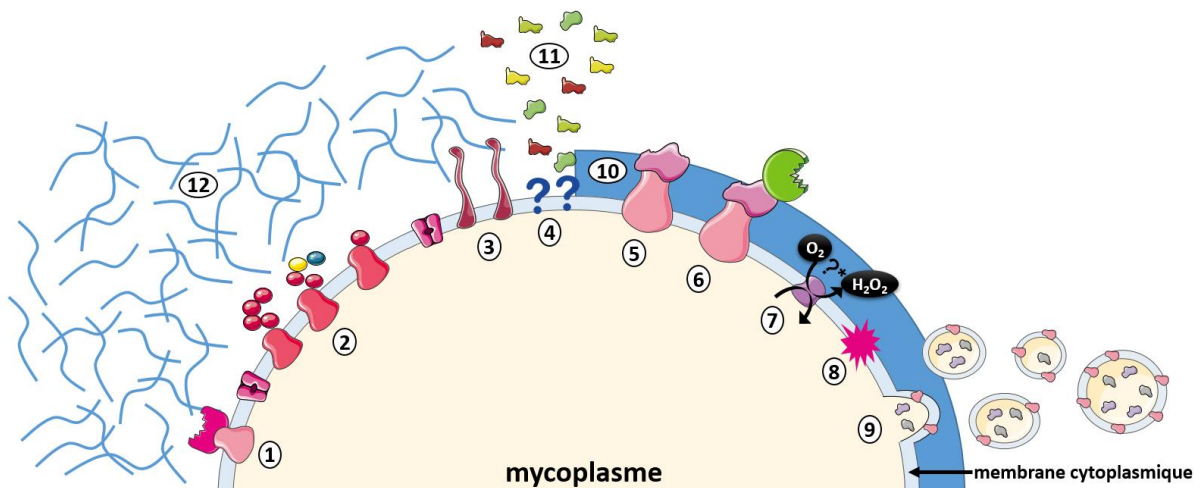


Figure 10: **Le secrétome des mycoplasmes** et le potentiel lien avec la virulence. 1 : Enzyme de surface dégradant les Immunoglobulines ; 2 : Variation antigénique ; 3 : Lipoprotéines ; 4 : Voies de sécrétion (peu documentées chez les mycoplasmes) ; 5 : Adhésines ; 6 : Adhésines immobilisant le plasminogène ; 7 : Production de peroxyde d'hydrogène grâce à la glycérolphosphate oxydase (?* : la localisation membranaire est en cours de discussion (Schumacher, Nicholson et al. 2019) ; 8 : Toxine CARDS ; 9 : Production de vésicules extracellulaires ; 10 : Production de polysaccharides capsulaires ; 11 : Protéines présentes dans le milieu extracellulaire ; 12 : Exopolysaccharides

Comme ce secrétome est en contact direct avec le milieu environnant et notamment les cellules et molécules de l'hôte, il est potentiellement impliqué dans la virulence. Si on adopte cette définition, parmi les composés impliqués dans la virulence et mis en évidence chez les mycoplasmes, la grande majorité appartiennent au secrétome (Figure 10) (Tableau 5).

Tableau 5 : **Facteurs de virulence décrits durant cette introduction**, mécanisme associé et localisation :

Espèce	Nom du facteur de virulence	Mécanisme principal de virulence	Localisation	Références
<i>M. agalactiae</i>	Lipoprotéines Vpmas	E	Surface	(Glew, Papazisi et al. 2000)
<i>M. bovis</i>	Enzyme NADH oxydase	A	Membranaire + cytoplasme	(Zhao, Zhang et al. 2017)
<i>M. bovis</i>	Enzyme TrmFO	A	Membranaire + cytoplasme	(Guo, Zhu et al. 2017)
<i>M. bovis</i>	Enzyme FBA	A	Membranaire + cytoplasme	(Gao, Bao et al. 2018)
<i>M. bovis</i>	Enzyme α -enolase	A	Membranaire + cytoplasme	(Song, Li et al. 2012)
<i>M. bovis</i>	Lipoprotéine P27	A	Surface	(Chen, Huang et al. 2018)
<i>M. bovis</i>	Lipoprotéines Vsps	E	Surface	(Behrens, Heller et al. 1994)
<i>M. bovis</i>	Nucléase MBOV_RS02825	E	Surface + extracellulaire	(Zhang, Zhao et al. 2016)
<i>M. gallisepticum</i>	Protéine GapA	A	Surface	(Papazisi, Frasca et al. 2002)
<i>M. gallisepticum</i>	Protéase CysP	E	Membranaire	(Cizelj, Bercic et al. 2011)
<i>M. genitalium</i>	Protéine M	E	Membranaire	(Grover, Zhu et al. 2014)
<i>M. hyopneumoniae</i>	Protéine P97	A	Surface	(Zhang, Young et al. 1995)
<i>M. hyopneumoniae</i>	Protéine P102	A	Surface	(Seymour, Jenkins et al. 2012)
<i>M. hyopneumoniae</i>	Enzyme MHJ_0125	A	Surface	(Robinson, Buchtmann et al. 2013)
<i>M. hyopneumoniae</i>	Enzyme MHJ_0461	A	Surface	(Jarocki, Santos et al. 2015)
<i>Mmc</i>	Complexe MIB-MIP	E	Membranaire	(Arfi, Minder et al. 2016)
<i>Mmm</i>	Enzyme GlpO (production d'H ₂ O ₂)	C	Membranaire ou cytoplasmique	(Pilo, Vilei et al. 2005)
<i>Mmm</i>	Protéine P19	A	Membranaire + cytoplasme	(Zhou, Wang et al. 2016)
<i>Mmm</i>	Lipoprotéine Vmm	E	Surface	(Persson, Jacobsson et al. 2002)
<i>Mmm</i>	Lipoprotéines LppA, et LppQ	I	Membranaire	(Monnerat, Thiaucourt et al. 1999, Abdo, Nicolet et al. 2000)
<i>Mmm</i>	Polysaccharides (CPS)	I	Association étroite avec la membrane	(Bertin, Pau-Roblot et al. 2013)
<i>Mmm</i>	Polysaccharides (EPS)	I	Polysaccharides libres	(Bertin, Pau-Roblot et al. 2013)
<i>M. penetrans</i>	Toxine MYPE9110	C	Membranaire	(Johnson, Kannan et al. 2009)
<i>M. pneumoniae</i>	Protéine P1	A	Surface	(Krause et Baseman 1983)
<i>M. pneumoniae</i>	Toxine CARDS	C	Membranaire + cytoplasme	(Hardy, Coalson et al. 2009)

A : Adhésion ; E : Echappement ; I : Immuno-modulation ; C : Pouvoir cytotoxique

Comme le montre le Tableau 5, ces facteurs de virulence sont majoritairement présents à la surface des mycoplasmes. Peu d'études se sont intéressées aux molécules sécrétées dans le milieu extracellulaire par les mycoplasmes. Une des contraintes majeures associée à l'étude des molécules extracellulaires provient du fait que les milieux de culture utilisés pour les mycoplasmes sont des milieux riches, supplémentés en sérum et extrait de levure apportant de nombreuses molécules non caractérisées (Voros, Dunnett et al. 2009). Par ailleurs, la mise au point d'un milieu de culture défini est un challenge puisque les mycoplasmes sont des bactéries exigeantes et qu'il faut donc trouver un compromis entre la richesse du milieu liée aux exigences du mycoplasme et le type de molécules mycoplasmiques à purifier. En effet, le milieu utilisé doit en premier garantir la synthèse des molécules à purifier et être adapté à la nature de celles-ci. Par exemple, dans le cas des protéines extracellulaires, il ne doit pas entraîner la lyse des mycoplasmes, qui pourrait apporter des composés cytoplasmiques, ni contenir de peptides exogènes en trop grande quantité.

Pour l'étude des exopolysaccharides présents dans le surnageant de culture de *Mmm*, un milieu chimiquement défini, le CMRL-1066, a été utilisé (Bertin, Pau-Roblot et al. 2013). Ce milieu a permis de caractériser les polysaccharides libres sans la présence de polysaccharides contaminants provenant du milieu de culture complexe. En plus de l'utilisation d'un milieu défini, les auteurs ont mis au point une approche de purification des polysaccharides sécrétés. Ce milieu permet de maintenir une certaine viabilité durant les 24 premières heures (10^9 à 10^8 CFU/ml) mais celle-ci diminue jusqu'à 10^7 CFU/ml au bout de 96h.

Dans une autre étude, la détection d'une nucléase de *M. bovis* dans le milieu extracellulaire n'a pas nécessité la mise au point d'un milieu défini puisqu'un anticorps ciblant la protéine était disponible (Zhang, Zhao et al. 2016). Cette approche permet l'utilisation d'un milieu complexe mais ne permet que la caractérisation d'une seule protéine à la fois.

Des études s'intéressant au protéome extracellulaire total, ou exoprotéome, ont été menées sur 4 espèces, *M. capricolum* subsp. *capricolum*, *M. synoviae*, *M. hyopneumoniae* et *M. flocculare* (Rebollo Couto, Klein et al. 2012, Voros, DeLongchamp et al. 2015, Paes, Lorenzatto et al. 2017, Leal Zimmer, Paludo et al. 2019). Ces études ont principalement utilisé des milieux définis dépourvus ou limités en sérum pour réduire le niveau de contamination de protéines issues du milieu de culture. Ces trois études ont également utilisé la même approche consistant à réaliser une culture dans un milieu riche, suivi par le transfert des cellules de mycoplasmes, après lavage, dans un milieu sans sérum dont le surnageant est récupéré en fin d'incubation. Les facteurs variant entre ces études sont les milieux utilisés ainsi que le nombre de lavage effectués avant le transfert.

Ces facteurs sont résumés dans le Tableau 6 ci-dessous.

Tableau 6: *Comparaison des études du sécrétome menées sur 4 espèces*

	Milieu de pré-culture	Milieu « sans sérum »	Nombre de lavage avant transfert	Centrifugation	Référence
<i>Mcc</i>	MEM + sérum de cheval (20%)	Milieu de pré-culture filtré sur un filtre de cut off de 10 kDa.	1 (en PBS)	13000rpm 30min 4°C	(Voros, DeLongchamp et al. 2015)
<i>M. synoviae</i>	Frey + sérum porcin (12%)	Frey sans sérum	3 (en milieu « sans sérum »)	Non indiqué	(Rebollo Couto, Klein et al. 2012)
<i>M. hyopneumoniae</i> et <i>M. flocculare</i>	Friis + sérum bovin (25%)	MEM	3 (en PBS)	3500xg 15min	(Leal Zimmer, Paludo et al. 2019)

Pour l'étude de deux mycoplasmes porcins, *M. hyopneumoniae* et *M. flocculare* les lavages et l'utilisation d'un milieu sans sérum n'ont pas permis d'éliminer totalement les protéines provenant du milieu de pré-culture. Lorsque les auteurs interrogent les bases de données pour identifier les protéines du surnageant, 35 sont suspectées être des protéines bovines qui seraient donc des protéines contaminantes issues du sérum (Leal Zimmer, Paludo et al. 2019). Les précautions prises, lavages et changement de milieu, permettent donc de limiter la contamination par des protéines sériques sans les éliminer totalement. En revanche, la plupart de ces études n'ont pas tenu compte de la mort cellulaire et donc de la lyse bactérienne lors de l'incubation dans le milieu sans sérum, qui pourrait apporter des protéines cytoplasmiques dans le surnageant de culture. Seule l'étude de Voros et ses collaborateurs s'est intéressée d'une part à la viabilité dans un milieu où le sérum a été filtré et d'autre part à l'activité lactate déshydrogénase dans le surnageant de culture alors qu'elle est attendue dans le contenu cellulaire (Voros, Dunnett et al. 2009). Celle-ci est retrouvée dans le surnageant, en quantité 10 fois moins importante que dans le contenu cellulaire ; suggérant une lyse bactérienne. Il est donc important de s'assurer que toute protéine retrouvée dans le surnageant a bien fait l'objet d'une sécrétion active.

Lors de l'analyse des protéines sécrétées par *M. hyopneumoniae* et *M. flocculare* ; 2/3 des protéines identifiées (88 protéines sur 148) ne présentaient pas de peptide signal détecté *in silico* et recherché selon 4 algorithmes (SecretomeP, SignalP, PrediSI et Phobius). Parmi le 1/3 restant, seulement 26 protéines présentaient un motif de sécrétion détecté par au moins deux algorithmes et 34 protéines avaient un motif de sécrétion incertain car détecté par moins de 2 algorithmes (Leal Zimmer, Paludo et al. 2019). De même, pour l'étude du sécrétome de *Mcc*, parmi les 40 protéines détectées dans le surnageant, 9 possédaient un peptide signal détecté par le programme Exprot. Sur ces 9 protéines, 8 étaient des lipoprotéines (Voros, DeLongchamp et al. 2015).

Ces données mettent en évidence le fait que les programmes de prédiction de sécrétion ne sont pas parfaitement adaptés aux mycoplasmes. La plupart de ces algorithmes reposent sur la recherche de motifs de sécrétion associés aux voies de sécrétion SEC et TAT ainsi qu'aux motifs de clivage des « signal peptidases » I et II. Or, chez les mycoplasmes, seules certaines protéines de la voie SEC sont retrouvées *in silico* par homologie, dans les génomes de *M. genitalium*, *M. pneumoniae*, *M. gallisepticum*, *M. hyopneumoniae* ou encore *Mccp* (Fraser, Gocayne et al. 1995, Himmelreich, Hilbert et al. 1996, Papazisi, Gorton et al. 2003, Minion, Lefkowitz et al. 2004, Chen, Hao et al. 2017).

La voie SEC décrite chez *Escherichia coli* est un système permettant aux protéines de traverser la membrane cytoplasmique sous forme dépliée. Grâce à une séquence signal hydrophobe composée de 20 résidus amino acyls localisés du côté N-term, la protéine tout juste synthétisée va être prise en charge par une protéine chaperonne SecB. Elle va permettre de limiter le repliement de la protéine durant son transport jusqu'à la protéine SecA située à l'entrée du pore (voie b de la Figure 11). La protéine SecA est une ATPase fournissant l'ATP nécessaire au fonctionnement du transport au travers du pore, constitué de nombreuses protéines (Sec D/F, SecE, SecG, SecY). Les protéines destinées à être localisées au niveau de la membrane cytoplasmique sont prises en charge par une voie alternative nommée SRP. Comme ces protéines sont composées d'un peptide signal fortement hydrophobe, elles sont traduites directement dans le pore membranaire par le ribosome (voie a de la Figure 11).

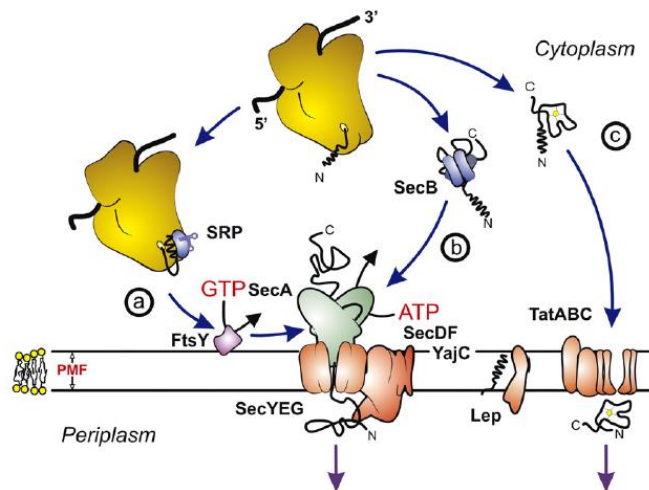


Figure 11 : Représentation schématique de la voie de sécrétion SEC (Natale, Bruser et al. 2008)

Chez *Mccp*, les gènes codant les protéines SecG, SecE, SecY du pore ont été détectés ainsi que les gènes codant l'ATPase SecA et le récepteur de la voie SRP (FtsY) (Chen, Hao et al. 2017). Le même type de résultat a été observé pour les génomes de *M. pneumoniae* et *M. genitalium* excepté qu'ils ne contiennent pas les gènes codant les protéines SecG et SecE (Fraser, Gocayne et al. 1995, Himmelreich, Hilbert et al. 1996).

Suite à leur passage au travers de la membrane les protéines peuvent être libérées par une signal peptidase qui va cliver le peptide signal de la protéine nouvellement sécrétée. Le gène de la signal peptidase des lipoprotéines (*lspA*) a été retrouvé dans les génomes de *M. genitalium*, *M. hyopneumoniae* et *Mccp*. En revanche, les analyses *in silico* n'ont pas permis de mettre en évidence la présence d'une signal peptidase de type I que chez certaines espèces : *M. gallisepticum*, *M. pulmonis* ou encore *M. hyopneumoniae* (Chambaud, Heilig et al. 2001, Papazisi, Gorton et al. 2003, Minion, Lefkowitz et al. 2004). Chez *M. pneumoniae* l'activité d'une signal peptidase est suspectée malgré que son gène ne soit pas détecté (Himmelreich, Hilbert et al. 1996). Avec un marquage de l'extrémité N-term de la protéine P40 mature de *M. pneumoniae* et l'utilisation de la spectrométrie de masse, un site de clivage est détecté entre le 25^{ème} et le 26^{ème} résidu amino-acyls (Catrein, Herrmann et al. 2005). Cela ne démontre pas la présence d'une signal peptidase mais uniquement l'existence d'une zone de clivage du côté N-term. Une autre étude s'est intéressée à une protéine annotée comme signal peptidase I produite cette fois-ci chez *M. hyopneumoniae* (Moitinho-Silva, Heineck et al. 2012). La production d'une protéine recombinante (rMhSPase I) a permis de démontrer que c'est une protéine immunogénique sans pour autant démontrer son activité de signal peptidase. De plus, aucune homologie n'a été observée chez les mycoplasmes des ruminants. La présence d'une signal peptidase de type I n'est donc, pour le moment, détectée que *in silico*, ce qui nécessite des recherches complémentaires.

Parmi les autres voies de sécrétion, aucun gène codant pour des protéines de la voie TAT, permettant le passage des protéines repliées, n'a été détecté chez les mycoplasmes. Ces systèmes SEC et TAT permettent le passage au travers de la membrane cytoplasmique mais chez les Gram – d'autres voies de sécrétion en complément de SEC et TAT ou indépendantes de SEC et TAT sont nécessaires pour le transport de protéines vers le milieu extracellulaire ou vers les cellules de d'hôte. En tout, 6 voies de sécrétion (T1SS, T2SS, T3SS, T4SS, T5SS et T6SS) ont été décrites chez les Gram- et aucune homologie n'a été détectée chez les mycoplasmes (Figure 12).

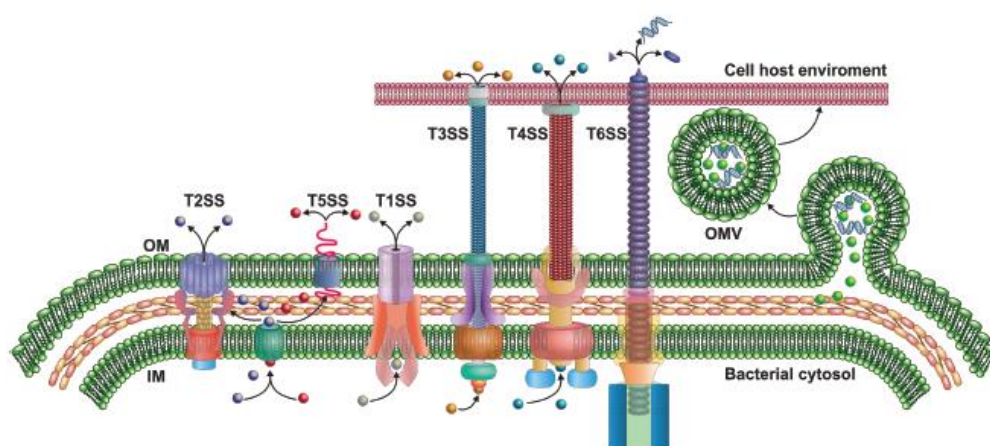


Figure 12: **Les voies de sécrétion des Gram -** - d'après Guerrero-Mandujano 2017

Une dernière voie de sécrétion chez les Gram -, appelée voie de sécrétion de type 0, a été proposée récemment et permettrait la sécrétion de composés dans le milieu extracellulaire via la formation de vésicules extracellulaires (VEs) (Guerrero-Mandujano, Hernandez-Cortez et al. 2017). Les VEs sont des sphères protéolipidiques non répliquatives activement sécrétées par toutes cellules vivantes. Chez les bactéries les vésicules dérivent des membranes (cytoplasmique et/ou externe) et possèdent une taille comprise entre 20 et 400nm de diamètre (Prados-Rosales, Baena et al. 2011, Brown, Kessler et al. 2014, Olaya-Abril, Prados-Rosales et al. 2014). Elles sont décrites depuis les années 1960 chez les Gram- et ont été présentées plus récemment chez les Gram + (à partir de 1990). Les VEs sont importantes pour la virulence bactérienne car elles transportent de nombreux facteurs de virulence (Rivera, Cordero et al. 2010, Elluri, Enow et al. 2014, Wagner, Joshi et al. 2018) qui vont alors être libérés dans le milieu extracellulaire et agir sur de longues distances (Bomberger, Maceachran et al. 2009). Elles permettent également la sécrétion de composés hydrophobes et insolubles dans le milieu extracellulaire aqueux (Guerrero-Mandujano, Hernandez-Cortez et al. 2017).

De par leur contenu, elles participent également à la stimulation de la réponse immunitaire, ce qui en fait une cible vaccinale de choix (Liu, Defourny et al. 2018, Tartaglia, Breyne et al. 2018). D'autant plus que les molécules exposées sont dans leur conformation native et que les VEs ont des propriétés adjuvantes en elles-mêmes.

Comme les mollicutes ne sont pas dotés de paroi, il est possible de se demander si ces bactéries sont capables de former des vésicules. A ce jour, peu d'études s'y sont intéressées et ont principalement portées sur *A. laidlawii* ainsi que plus modestement sur *M. gallisepticum* (Chernov, Chernova et al. 2011). Ces vésicules sont observées par microscopie électronique à la surface des cellules d'au moins 300nm et dans l'environnement proche d'*A. laidlawii* (Chernov, Chernova et al. 2011). Les recherches sur le rôle potentiel et le contexte de formation de ces structures chez les mycoplasmes n'ont été menées que sur *A. laidlawii*. Elles ont montré que la formation de vésicules est stimulée lors de conditions stressantes comme la privation nutritionnelle. Elles transportent environ 7% du protéome d'*A. laidlawii* dont des protéines annotées *in silico* comme impliquées dans la virulence bien que cette espèce ne soit pas considérée comme pathogène (Chernov, Mouzykantov et al. 2014).

Des vésicules d'*A. laidlawii* injectés à des plants de riz (Chernov, Chernova et al. 2012) induisent des lésions structurales des tissus. Malheureusement, il n'est pas possible de déterminer la part de ces vésicules dans l'induction de lésion puisque les lésions induites par une culture d'*A. laidlawii* entière n'ont pas été mesurées. Une autre approche sur des cellules humaines a montré que la co-culture de vésicules d'*A. laidlawii* avec des lymphocytes humains entraînait une aberration chromosomale de l'ordre de 95% des cellules contre 15% en présence de cellules d'*Acholeplasma* entières (Chernov, Chernova et al. 2011). Comme *A. laidlawii* est une espèce dont le pouvoir pathogène n'est pas établi, le réel rôle de ces vésicules dans la virulence reste hypothétique. Le mécanisme de formation de ces structures reste totalement méconnu à ce jour. Il serait intéressant d'étudier l'existence éventuelle et le rôle de ces VEs chez d'autres mollicutes.

Comme peu d'informations sont disponibles sur les voies de sécrétion des mycoplasmes, il n'est pas possible de se baser uniquement sur les prédictions *in silico* pour rechercher des protéines sécrétées. En effet, les modèles de prédiction sont peu adaptés à l'étude des mycoplasmes. Mais ces prédictions peuvent être utilisées à des fins informatives en complément de recherches expérimentales.

5. Contexte et objectifs de l'étude :

Le genre *Mycoplasma* regroupe 19 (sous) espèces pathogènes pour les ruminants. Parmi les facteurs de virulence mis en évidence, la majorité sont des protéines présentes à la surface membranaire mycoplasmique (Tableau 5). Ces protéines participent à diverses étapes de l'interaction avec l'hôte à savoir l'adhésion, l'immunomodulation ou l'échappement à la réponse immunitaire ainsi qu'à la cytotoxicité. Pour autant, les mécanismes moléculaires associés à la pathogénèse des mycoplasmes des ruminants restent mal connus. L'étude des protéines libérées dans le milieu extracellulaire appartenant à l'exosécrétome pourrait permettre d'identifier de nouvelles protéines en interaction avec l'hôte.

Peu d'études se sont intéressées aux composés de l'exosécrétome car les mycoplasmes sont cultivés dans des milieux riches supplémentés en sérum et extrait de levure qui apportent de nombreuses protéines. Certains travaux ont pourtant montré la présence dans le milieu extracellulaire d'exopolysaccharides ayant des propriétés anti-inflammatoires ainsi que d'une nucléase (MBOV_RS02825) dégradant les NETs (Bertin, Pau-Roblot et al. 2013, Bertin, Pau-Roblot et al. 2015, Zhang, Zhao et al. 2016). Des approches de spectrométrie de masse ont permis d'observer 20 à 60 protéines potentiellement sécrétées par les mycoplasmes (Rebollo Couto, Klein et al. 2012, Voros, DeLongchamp et al. 2015, Paes, Lorenzatto et al. 2017). Ces résultats ont été obtenus sur une seule ou 2 espèces à la fois dans des milieux limités ou ne contenant pas de sérum donc différents de ceux utilisés habituellement. De plus, les auteurs ne se sont pas intéressés à la fonctionnalité des protéines identifiées ni au mécanisme de leur sécrétion. Durant cette thèse nous avons donc choisi d'utiliser une approche différente. Elle consiste à étudier des vésicules extracellulaires qui pourraient théoriquement être purifiées à partir de milieu complexe. Nous nous sommes également intéressés aux activités protéasiques extracellulaires pouvant également être détectées en milieu complexe et qui pourraient être recherchées chez de nombreuses espèces simultanément permettant de réaliser un screening large multi-espèces.

En amont de cette thèse, aucune étude ne s'était intéressée à la caractérisation de protéases actives extracellulaires. Chez d'autres bactéries, les protéases extracellulaires sont pourtant des facteurs de virulence participant à la dégradation de la matrice extracellulaire ou à la désorganisation de la réponse immunitaire (Laarman, Mijnheer et al. 2012, Kolar, Ibarra et al. 2013, Pietrocola, Nobile et al. 2017). Nous avons donc cherché à identifier les protéases présentes dans les surnageants de culture de différentes espèces mycoplasmiques. Comme peu d'information était disponible dans la littérature nous avons réalisé un crible large et nous nous sommes intéressés à 13 espèces pouvant être isolées des voies respiratoires des ruminants et sur lesquelles nous avons évalué l'activité caséinolytique extracellulaire permettant de détecter différents types de protéases. Ces recherches seront présentées dans la seconde partie de ce manuscrit.

Nous nous sommes également intéressés à un autre élément de l'exosécrétome, les vésicules extracellulaires (VEs). Celles-ci pourraient participer à la sécrétion de protéines, d'ADN etc... dans le milieu extracellulaire. Or chez les mycoplasmes les voies de sécrétion restent énigmatiques, ces vésicules pourraient donc être une voie alternative permettant de sécréter des protéines dans le milieu extracellulaire (Guerrero-Mandujano, Hernandez-Cortez et al. 2017). Les vésicules ont été décrites dans la littérature chez un *Mollicutes*, *A. laidlawii* et des recherches menées à l'UMR mycoplasmoses des Ruminants (ANSES- VetAgro-Sup) ont permis d'envisager que ces structures puissent être produites par des mycoplasmes des ruminants (Chernov, Chernova et al. 2011, Gaurivaud, Ganter et al. 2018). Pour faire suite au travail initié à l'UMR nous nous sommes intéressés à la composition membranaire de ces vésicules. Nous nous sommes également demandés si elles étaient produites par des bactéries viables ou si elles résultaient d'un processus dégénératif comportant une ré-association aléatoire de fragments membranaires. Ces recherches seront décrites dans la troisième partie de cette thèse au cours du premier chapitre.

Dans le second chapitre de nos recherches consacrées au VEs, nous avons cherché à améliorer l'approche de purification des VEs mycoplasmique afin de pouvoir *in fine* caractériser l'ensemble de l'exosécrétome vésiculaire. En effet, l'identification des protéines cytoplasmiques présentes à l'intérieur des vésicules nécessite de disposer de matériel de qualité suffisante permettant de limiter les potentielles contaminations par des mycoplasmes lysés et leurs protéines cytoplasmiques. Nous nous sommes donc intéressés à la fois aux conditions favorisant la production de VEs, à savoir si la modulation du pH pourrait participer à la formation de VEs, ainsi qu'aux conditions permettant de les purifier. Ces recherches sont présentées dans le second chapitre de la partie III de ce manuscrit.

Les travaux de cette thèse se sont appuyés sur les souchothèques des deux laboratoires d'accueil. Nous avons également utilisé une souche mutante obtenue de l'équipe du Dr. M. Brown (Université de Floride). Nous avons bénéficié d'un appui technique pour les identifications des protéines par spectrométrie de masse de la part des plateformes ProGénoMix du CEA et PAPPSO de l'INRA. Pour l'étude des vésicules, j'ai utilisé un savoir-faire qui a été développé au laboratoire de Lyon en amont de cette thèse. La possibilité d'utiliser les ultracentrifugeuses de l'UMR 5086 de l'IBCP et de l'équipe MND du laboratoire de Lyon ainsi que le microscope électronique à transmission de la plateforme CTμ de l'université de Lyon ont contribué au bon déroulement de ce travail.

La dernière partie (IV) de cette thèse propose une discussion générale pour l'ensemble des résultats obtenus.

PARTIE II

Partie II : La recherche d'activité protéasique extracellulaire.

1. Contexte et stratégie de recherche :

Parmi les éléments du sécrétome, les protéases libérées dans le milieu extracellulaire sont classiquement présentées chez les bactéries pathogènes comme des facteurs de virulence intervenant dans de nombreuses étapes de l'infection. Ces protéases extracellulaires participent au détournement du système immunitaire inné en agissant sur la fibrinolyse, la signalisation inflammatoire, la voie du complément et la phagocytose (Potempa et Pike 2009). Par exemple, la staphopain B (SspB) de *Staphylococcus aureus* est une protéase à cystéine aux fonctions multiples. Elle participe au détournement des activités de phagocytoses des macrophages qui vont dégrader les neutrophiles suite au clivage de l'immunoglobuline de surface CD31 (Smagur, Guzik et al. 2009). Elle agit également sur plusieurs protéines impliquées dans la coagulation comme le fibrinogène ou le kininogène (Massimi, Park et al. 2002, Imamura, Tanase et al. 2005, Kolar, Ibarra et al. 2013).

Chez les mycoplasmes, les activités caséinolytiques et gélatinolytiques étaient historiquement utilisées pour la taxonomie des mycoplasmes sans recherches spécifiques de la localisation de l'activité protéasique (Razin et Freundt 1984). Les activités protéasiques extracellulaires, en interaction avec les composants du système immunitaire, n'ont pour le moment pas été décrites. En revanche, des activités protéasiques de surface ont été observées chez plusieurs espèces et pourraient participer à la virulence en favorisant l'échappement au système immunitaire par clivage d'immunoglobulines. (ex : le système MIB-MIP ou la protéase CysP) (Partie I ; section 3.2.1.2) (Cizelj, Bercic et al. 2011, Arfi, Minder et al. 2016).

Un des objectifs de cette thèse était de détecter les protéases présentes dans le milieu extracellulaire et produites par des espèces isolées des voies respiratoires des ruminants. Nous avons choisi d'employer deux approches décrites dans la littérature permettant la détection d'activité protéolytique extracellulaire, l'utilisation de la caséine marquée (dans notre cas de la caséine fluorescente) et des géloses au lait. Ces deux approches permettent de réaliser un crible large et de tester de nombreuses espèces simultanément. Pour cette étude 32 souches ont pu être analysées. De plus ces approches permettent de détecter une activité protéolytique même en milieux complexes supplémentés en sérum et extrait de levure, utilisés pour la culture mycoplasmaïque.

Pour pouvoir identifier par spectrométrie de masse les protéases extracellulaires nous avons ensuite dû rechercher un milieu défini n'apportant pas de protéines sériques ou de protéines issues de l'extrait de levure. Des milieux de cultures définis ont été décrits dans la littérature, cependant ils étaient soit spécifiques à une espèce particulière soit ils ne permettaient pas de garantir un maintien du titre et pouvaient donc potentiellement exposer nos recherches à des protéines issues de lyse cellulaire qui contamineraient les surnageants de culture. Nous avons donc évalué l'utilisation d'un milieu défini adapté à un maximum d'espèces et permettant de caractériser le surnageant de culture par spectrométrie de masse. L'existence dans les bases de données de génomes pour la plupart des espèces, nous a permis d'identifier des protéines sécrétées annotées *in silico* comme des protéases. Afin de déterminer si certaines sont fonctionnelles, nous avons évalué la présence de protéases capables de digérer la caséine sur zymogramme à partir de surnageants concentrés. Enfin, l'utilisation d'un mutant nous a permis de nous intéresser plus particulièrement aux éventuels rôles et substrats d'une protéase extracellulaire.

Publication soumise et acceptée dans la revue AEM le 10 septembre 2019

Proteases as secreted exoproteins in mycoplasmas from ruminant lungs and impact on surface exposed proteins.

Sarah Ganter^{ab}, Guylaine Miotello^c, Lucía Manso-Silván^{ad}, Jean Armengaud^c, Florence Tardy^{be}, Patrice Gaurivaud^{be}, François Thiaucourt^{ad*}

CIRAD, UMR ASTRE, F-34398 Montpellier, France^a ;
Université de Lyon, ANSES, Laboratoire de Lyon, UMR Mycoplasmoses des Ruminants, Lyon, France^b ;
Laboratoire Innovations technologiques pour la Détection et le Diagnostic (Li2D), Service de Pharmacologie et Immunoanalyse (SPI), CEA, INRA, F-30207 Bagnol-sur-Cèze, France^c ;
INRA, UMR1309 ASTRE, F-34398, Montpellier, France^d ;
Université de Lyon, VetAgro Sup, UMR Mycoplasmoses des Ruminants, Marcy-L'étoile, France^e

2. Abstract:

Many mycoplasma species are isolated from the ruminant lungs as either saprophytes or true pathogens. These wall-less bacteria possess a minimal genome and reduced metabolic capabilities. Accordingly, they rely heavily on their hosts for the supply of essential metabolites, and notably peptides. Seven out of thirteen ruminant lung-associated *Mycoplasma* (sub)species were shown to possess a caseinolytic activity when grown in rich media and assessed with a quantitative fluorescent test. For some species, this activity was detected in spent medium, an indication that proteases were secreted outside the mycoplasma cells. To identify these proteases we incubated concentrated washed cell pellets in a defined medium and analyzed the supernatants by tandem mass spectrometry. A secreted protease activity was detected mostly in the species belonging to the mycoplasma mycoides cluster and, to a lesser extent, in *Mycoplasma bovirhinis*. When analyzing a *M. mycoides* subsp. *capri* strain, chosen as a model, we identified expressed 35 proteases out of 55 predicted coding genes, of which 5 were preferentially found in the supernatant. A serine protease S41, acquired by horizontal gene transfer, was responsible for the caseinolytic activity, as demonstrated by zymography and mutant analysis. In the *M. capricolum* mutant the inactivation of the S41 protease resulted in a marked modification of the expression or secretion of 17 predicted surface exposed proteins. This is an indication that the S41 protease could have a role in post translational cleavage of surface exposed proteins and ectodomain shedding, whose physiological impacts still need to be explored.

3. Importance:

Few studies are pertaining to proteases in ruminant mycoplasmas. Here we focus on proteases that are secreted outside the mycoplasma cell using a mass spectrometry approach. The most striking result is the identification, within the mycoplasma mycoides cluster, of a serine protease that is exclusively detected outside the mycoplasma cells and is responsible for casein digestion. This protease may also be involved in the post-translational processing of surface proteins, as suggested by analysis of mutants showing a marked reduction in the secretion of extracellular proteins. By analogy, this finding may help understanding the mechanisms underlying this ectodomain shedding in other mycoplasmas species. This protease-coding gene is likely to have been acquired via horizontal gene transfer from gram-positive bacteria and sortase-associated surface proteases. Whether this protease, and the associated ectodomain shedding, are related to virulence needs yet to be ascertained.

4. Introduction

Bacteria belonging to the *Mycoplasma* genus can colonize many animal hosts. They are wall-less and have very small genomes, typically around 1000kbp, resulting from reductive evolution from low G+C Firmicutes. Consequently, they depend on their host for the supply of cholesterol, amino-acids, nucleotides, etc. They are often host specific and many are pathogenic. Mycoplasmas colonizing ruminants are a good study model, as they comprise a huge diversity of species and include the type species of the genus, *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (Mmm). Mmm was the first mycoplasma to be isolated, in 1898 **(1)**, and is the causative agent of contagious bovine pleuropneumonia, a disease notifiable to the world organization for animal health (OIE). Like many other ruminant mycoplasmas, Mmm shows a marked tissue tropism towards the respiratory tract, where it induces severe lesions. It therefore came somewhat as a surprise that no obvious virulence factors were identified when the entire Mmm genome was sequenced **(2)**. A decade later, Browning et al illustrated the complexity of mycoplasma pathogenesis that is « predominantly attributable to the immunopathological response of the host to the persistence of these pathogens ». This suggested that any gene involved in optimal adhesion, efficient nutriment scavenging, immune evasion or immunomodulation and that is not required for *in vitro* growth might be involved in virulence **(3)**. In this general picture, H₂O₂ production was a notable exception, as it corresponds to one of the few cases of cyto-toxic compounds production by mycoplasmas **(4)**. However, H₂O₂ may not be indispensable for strain virulence **(5)**. Until recently, mycoplasma virulence studies have focused mainly on interactions between the surface of the bacteria and its host. It was clear that mycoplasma immunopathology was linked to an imbalanced immunological response leading to exacerbated inflammation. Extensive work was performed to try

and decipher the immune responses of the hosts, from as early as 1971 (6) and up to recently (7). However, there is also a body of work focusing on the mycoplasma cells associated pathogenesis. *Mycoplasma bovis*, for example, is able to display a wide array of variable surface antigens coded by variable surface lipoproteins (Vsps) (8). The *in vivo* variability of Vsps, together with immunological factors of the host, may contribute to mycoplasma persistence and immunomodulation (9) (10). More recently, the targeted proteolysis of surface antigens, coupled with variable cleavage efficiency, was identified as another mechanism participating in the diversification of surface-exposed antigens (11). In the porcine respiratory pathogen *Mycoplasma hyopneumoniae*, post-translational processing is an important mechanism for creating cell surface diversity (12), as 35 surface associated proteins were shown to be subjected to endoproteolytic cleavage. These modifications, affecting adhesins, lipoproteins or moonlighting proteins, are likely to expand the mycoplasma antigen repertoire of the mycoplasma cell surface. Proteolytic cleavage often enhances the binding of host molecules such as plasminogen, whose conversion into the serine protease plasmin may have an important impact on host tissues and immune effector molecules (13). Mmm and many other mycoplasma species also express a “Mycoplasma Immunoglobulin Protease”, together with a Mycoplasma Immunoglobulin Binding protein (14). This two-protein system allows the cleavage of host immunoglobulins and may therefore play a key role in immune evasion by mycoplasmas. Proteolysis obviously plays an important role in the natural history of mycoplasmas species. This has notably been studied in the porcine pathogen *M. hyopneumoniae*, where endoproteases are responsible for ectodomain shedding with profound impact on host pathogen interactions. A surface protein P159 is cleaved and this processing event generates new surface protein diversity, as well as functional redundancy in glycosaminoglycan and cilium-binding (15). In addition, aminopeptidase activity has been evidenced at the surface of this pathogen (16) (17). Fewer data are available for other lung pathogenic mycoplasmas. The aim of this study was to determine which proteases may be expressed in mycoplasmas colonizing ruminant lungs and if those proteases may be secreted outside the mycoplasma cell as part of an exoproteome. Naturally, this study was beset with the same difficulties encountered when studying extracellular exopolysaccharides (18), i.e. the need for rich and complex growth media to ensure mycoplasma growth. A similar approach was therefore adopted, based on the incubation of washed, concentrated mycoplasma cells into a defined medium allowing these mycoplasma cells to maintain their metabolism for some time. Secreted exoproteins were then analyzed by phenotypic tests such as digestion of skimmed milk and fluorescent casein, casein zymography as well as by tandem mass spectrometry. The main involvement of an extracellular protease was finally confirmed by the use of mutant strains from two species in which the mutation occurred in orthologous genes and for which the exported caseinolytic activity was abolished.

5. Materials and methods :

5.1. Mycoplasma strains and culture conditions.

At least two strains from thirteen mollicutes (sub)species that can be isolated from ruminant lungs were analyzed in this study (Table 1). The MSC_0281::pMT85/2res transposon mutant of Mmm strain 8740-Rita (Rita-mut), with insertion in the orthologue of Mmm PG1T MSC_0281, was selected from a mutant bank produced at CIRAD. The procedures for transformation and identification of pMT85/2res transposon insertion site sequences have been previously described (44). The *ctpA*::Tn4001t mutant of California Kid type strain, or Ck^T (Ck-mut) was kindly provided by Dr M. Brown (Department of Infectious Diseases and Pathology, College of Veterinary Medicine, University of Florida). This mutant was generated by random mutagenesis, the Tn4001t transposon being inserted in the *ctpA* (MCAP_0240) gene (22). All other strains were cultured in either M-Hayflick medium (44) either commercialized PPLO modified broth (Indicia, France). The Opti-MEM® GlutaMAX® medium (Gibco), depleted of proteins except for minute amounts of insulin and transferrin, was used to characterize the extracellular proteases. This defined medium was supplemented with 0.4% wt/vol pyruvic acid, 0.02% wt/vol DNA (herring sperm), to maintain cell viability, 0.1% wt/vol ampicillin, and filter-sterilized through a 0.1µm filter unit (Millex. Low Protein Binding Durapore, PVDF). Mycoplasma cultures were incubated at 37°C, 5% CO₂ in a humid atmosphere. Culture titers were evaluated by performing six ten-fold dilutions in m-Hayflick, and plating 10µl-aliquots of the last three dilutions on agar plates to quantify viable bacteria by colony counting.

5.2. Determination of global caseinolytic activity.

The proteolytic activity of mycoplasmas was investigated using casein as substrate. The overall caseinolytic activity of the mycoplasma strains was assessed by measuring the degradation of fluorescent casein using the “protease detection kit” (Jena Bioscience PP404S). The “Microtiter plate operation” protocol was used following the manufacturer’s instructions and fluorescence was measured using an Enspire 2300 fluorimeter (Perkin Elmer), with excitation at 490nm, emission at 525nm, 100 flashes and a top measurement height of 9.5mm. Except for Fig. S2, where the original relative fluorescence units (RFU) were retained, each fluorescence measurement was normalized using the kit’s positive control and the corresponding medium negative control, according to the following formula: Relative Activity (RA), expressed in percentage,

$$RA = 100X[(\log RFU_{\text{sample}}) - (\log RFU_{\text{medium}}) / (\log RFU_{\text{kit_positive_control}}) - (\log RFU_{\text{medium}})].$$

This approach was validated using strains belonging to three different *Mycoplasma* species, namely *M. mycoides* subsp. *capri* (Mmc) strain 95010, Mmm strain Gladysdale and *M. bovis* strain L2. The caseinolytic activity was measured in serial ten-fold dilutions, which were then incubated. The last tube showing some turbidity was considered to be in an exponential phase of growth while the preceding tubes were at later stages of growth, up to a stationary phase within the first tube of the series. The fluorescence was shown to be stable and at its maximum in the stationary phase for all three species (Fig. S2A). In our experimental conditions, the medium used for protease detection (Indicia vs m-Hayflick) had no significant impact on the overall activity of Mmc 95010, although m-Hayflick yielded a lower background (Fig. S2B). Finally, the robustness of this assay was demonstrated by analyzing three independent cultures of the same strains, which provided reproducible results (Fig. S2C).

The fluorescent casein test was also used to evaluate whether the activity was present in the culture supernatant or associated with the mycoplasma pellet. For this purpose, 1ml of stationary phase cultures were centrifuged at 12,000xg for 20 minutes at 4°C. The supernatants were filtered through a 0.1µm filter unit (Millex. Low Protein Binding Durapore, PVDF 0.1µm), while the pellet was re-suspended in the original culture volume (i.e., 1ml) of PBS (10 mM phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.8). The absence of residual viable mycoplasmas was confirmed by plating 10µl of the filtrated supernatant onto agar medium. The caseinolytic activity was measured as above for the two fractions. The same method was applied for the determination of global caseinolytic activity in exoproteome extracts. For this purpose, mycoplasmas grown in m-Hayflick until late exponential phase of growth were centrifuged 20 minutes at 12,000xg, washed twice in non-supplemented Opti-MEM® medium and concentrated thrice in supplemented Opti-MEM®. After incubation for 16 hours in supplemented Opti-MEM®, the cultures were centrifuged at 12,000xg for 20 minutes at 4°C. The pellets were resuspended in the same volume of PBS and the supernatants were filtered through 0.1µm filter units. The caseinolytic activities of the 16 hours cultures in Opti-MEM®, as well as supernatant and pellet corresponding to each culture, were determined as indicated above. Viability losses during Opti-MEM® incubation were evaluated by titration of the washed culture transferred into Opti-MEM® medium (T0 titer), and the same culture after the 16 hour incubation period.

5.3. Assessment of proteolytic activity on milk agar.

Milk agar plates were prepared by adding 0.4% (wt/vol) dried skimmed milk powder to m-Hayflick agar medium. Seven microliters of mycoplasma stationary phase cultures were plated and incubated for 60 hours. Casein degradation was then assessed against a dark background by evaluating the presence of a translucent area around the culture, indicating casein degradation (“-”: no translucent area; “+”: blurred and small translucent area; “++”: sharp and large translucent area).

5.4. Identification of Mmc 95010 and *M. bovirhinis* MV5 genes coding for putative protease motifs.

The table listing the proteases from *Mycoplasma mycoides* was retrieved from the MEROPS peptidase database (<https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/speccards?sp=sp003189;type=peptidase>). As this list included peptidases that were identified in three subspecies or serotypes, namely Mmm, Mmc serotype “LC” and Mmc serotype “capri” (locus tags MSC, MLC and MMCAP1 respectively), the corresponding genes in the genome of Mmc “LC” strain 95010 (NC_015431) were identified and duplicates discarded. This led to a table with 36 entries. However, additional genes bearing putative protease motifs could also be identified in genome annotations. To retrieve them, a query on the MaGe website was performed using the “search by keywords” tool and using “Protease OR peptidase” as query. (<https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/mage/viewer.php>). This led to the identification of 19 additional genes potentially coding for proteins with peptidase activity. In addition, the orthologous genes found in the *Mycoplasma mycoides* cluster (MMC) species were identified using the Mage interface. As *M. bovirhinis* genomes were not integrated in the MEROPS database, any proteins that may be potential peptidases were retrieved by searching the terms “peptidase OR protease” in the genome of strain HAZ 141_2 (accession AP018135)

5.5. Tandem mass spectrometry analysis of the exoproteome.

Mycoplasma cultures, incubated 16 hours in supplemented Opti-MEM® as described above, were centrifuged at 12,000xg for 20 minutes at 4°C. The cell pellets were resuspended in PBS and standardized to obtain 1mg/ml of proteins and the culture supernatants were filtrated through 0.1µm filters as above. The Opti-MEM® filtered supernatants were freeze-dried (2.5ml per vial). The freeze-dried supernatants were first reconstituted with 120µl of sterile milliQ water and then supplemented with 120µl of 2X Laemmli buffer. Samples were incubated for 5 minutes at 99 °C and then subjected to SDS-PAGE on a 4-12% NuPage (Invitrogen) with MES buffer (Invitrogen) for a short electrophoretic migration, as described previously (45). The whole-protein content from each well was extracted as a single polyacrylamide band, processed for in-gel digestion, and subjected to proteolysis with trypsin (Roche) using 0.01% ProteaseMAX surfactant (Promega) for 1 hour at 50°C. The resulting peptide fractions were analysed with a Q-Exactive HF tandem mass spectrometer (Thermo) coupled with an UltiMate 3000 LC system (Dionex-LC Packings) and operated in data-dependent mode as previously described (46). Peptides were analysed along a 90 min gradient of acetonitrile with scan cycles initiated by a full scan of peptide ions in the Orbitrap analyser, followed by high-energy collisional dissociation and MS/MS scans on the 20 most abundant precursor ions with 2+ or 3+ charges only. Full scan mass spectra were acquired from m/z 350 to 1800 at a resolution of 60,000. Ion selection for MS/MS fragmentation and measurement was performed applying a dynamic exclusion of 10 sec. MS/MS spectra were assigned to peptide sequences by the MASCOT Daemon 2.6.0 search engine (Matrix Science) searching against the corresponding annotated theoretical proteome database (Mmc FQ377874.1, Mmm CP002107.1, Mcc CP000123.1, Mccp LM995445.1, *M. bovirhinis* AP018135.1) with the following parameters: full-trypsin specificity, maximum of two missed cleavages, mass tolerances of 5 ppm on the parent ion and 0.02 Da on the MS/MS, carboxyamidomethylated cysteine (+57.0215) as a fixed modification, and oxidised methionine (+15.9949) and deamidation of asparagine and glutamine (+0.9848) as variable modifications. Only peptide matches presenting a MASCOT peptide score with a p-value of less than 0.05 were retained. Proteins were considered as identified when at least two peptides were assigned. For each protein, peptide-to-spectrum assignments were summed (spectral counts) and compared per conditions.

5.6. Method for identification of putative proteases enriched in supernatants versus cell pellets.

The number of detected spectral counts was recorded for each of the putative proteases in both fractions. As the total amount of spectral counts could vary from one sample to another, ratios were calculated by dividing the detected spectral count for each protein by the total number of spectral counts detected in the sample. This ratio yielded an estimated proportion of the protein in the sample that could be compared from one sample to another. A secondary ratio, or supernatant/pellet fold-change, was then calculated by dividing the ratio obtained for one protein in the supernatant by that obtained in the pellet. The distribution of fold-change values was evaluated by performing a frequency curve (Microsoft excel), with a range from 0 to 33 and intervals of 0.5 to detect outlier values.

5.7. Casein zymography.

To identify which proteases could digest casein, concentrated supernatants and mycoplasma cell pellets were first analyzed by SDS PAGE (7.5% acrylamide) followed by silver staining. Zymogram preparations were performed on 160x180mm, 1mm-thick gels. Running gels contained 7.5% wt/vol acrylamide in 1.5M Tris pH 8.8 buffer, 0.1% wt/vol SDS and ammonium persulfate, supplemented with 0.1% wt/vol casein and TEMED before polymerization. Stacking gels contained 3.75% wt/vol acrylamide, 0.5M Tris pH 6.8, 0.1% wt/vol SDS and ammonium persulfate, supplemented with TEMED before polymerization. Ten micrograms of each sample were loaded into each well of SDS-PAGE and zymogram gels, avoiding a boiling step. The migration conditions were 70V constant through the stacking gel, and 25mA constant through the running gel, until the migration front reached the bottom of the gel, all at 4°C. The gel was washed twice for 30 minutes in washing buffer (2.5% vol/vol Triton X-100, 50mM tris-HCL pH7.5, 5mM CaCl₂, 1μM ZnCl₂) and incubated for 24 hours in an incubation buffer that was similar to washing buffer, except for a concentration of Triton X-100 of 1%, instead of 2.5% vol/vol. The gel was then stained with bio-safe® staining solution (Bio-Rad) following manufacturer's instructions. Active casein proteases, revealed as translucent bands, were collected for further identification analysis by mass spectrometry. The cell pellets and concentrated supernatants were prepared in a similar way for mass spectrometry analysis.

5.8. Analysis of serine protease CBW53985.1 (MLC_2570).

The search for signal peptidase motifs was performed online with the SignalP v5.0 server for Gram positive bacteria (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) while transmembrane regions were detected by the TMHMM server v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). Blastp analysis was performed using the whole protein CBW53985.1 as query through the Genoscope MAGE interface with available genomes and then through the NCBI web site (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) using the conserved S41 region of CBW53985.1 on the non-redundant database and excluding *Mycoplasmas* (*Mycoplasmatales*, TaxID:2085).

6. Results :

6.1. Protease activity of mollicutes found in ruminant lungs.

The global peptidase activity of mollicutes found in the respiratory tract of ruminants was first estimated by a quantitative approach using whole cultures in complex medium and fluorescently-labelled casein as universal substrate. The caseinolytic activity of twenty-eight *Mycoplasma* and two *Acholeplasma* strains, corresponding to species usually isolated from ruminant lungs (Table 1) was assessed using two independent stationary phase cultures in modified-Hayflick's medium (m-Hayflick). There was a high heterogeneity of results from one species to another, while the results of different strains within a (sub)-species were usually homogeneous, with the notable exception of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* (Mccp), *M. putrefaciens*, *M. ovipneumoniae* and *M. bovirhinis*. The highest caseinolytic activities were measured for members of the mycoplasma mycoides cluster (MMC) with relative activity (RA) values varying from 47 to 95%. *M. leachii* and *M. mycoides* subsp. *capri* (Mmc) strains yielded the highest values. *M. ovipneumoniae* and *M. bovirhinis* strains presented values within this high range, though certain strains and culture replicates showed lower values. By contrast, *M. putrefaciens*, which is phylogenetically closely related to the MMC, displayed very low RA values, comparable to those of distant species such as *M. arginini* and *M. alkalescens* (RA: 4-29%). All other species provided intermediate values ranging from 23 to 74%. It is noteworthy that *M. agalactiae* showed lower values (RA: 23-30%) than its close relative *M. bovis* (RA: 41-49%). Strains from seven (sub)-species, namely Mccp, *M. capricolum* subsp. *capricolum* (Mcc), *M. mycoides* subsp. *mycoides* (Mmm), Mmc, *M. ovipneumoniae*, *M. bovirhinis* and *M. bovis*, displaying high overall activity, were selected for analysis of extracellular proteolytic activity. All these species displayed a tropism towards ruminant lungs. *M. arginini*, which showed low overall caseinolytic activity, was selected as a negative control.

In spite of their high caseinolytic activity, *M. leachii* strains were not included in subsequent analyses because current clinical cases are scarce and most often associated with polyarthritis, rather than pneumonia.

TABLE 1 Caseinolytic activity of mycoplasmas that can be isolated from ruminant lungs

Phylogenetic group	Species and subspecies	Main Host	Disease/Clinical signs	Strain	Isolation year	Country of origin	Overall caseinolytic activity ^a	
							assay 1	assay 2
Spiroplasma	<i>Mccp</i>	goat	Contagious caprine pleuropneumonia	16125	2016	Emirat-Arabe Unis	85	63
	<i>Mcc</i>	goat	Contagious Agalactiae	Abomsa	1982	Ethiopia	47	58
				CK ⁺	1955	USA	82	90
	<i>M. leachii</i>	cattle	Pneumonia	CK-mut	Allam et al 2010		40	45
				94157	1994	Ethiopia	87	79
				PG50 ⁺	1963	Australia	86	91
	<i>Mmm</i>	cattle	Contagious bovine pleuropneumonia	ML06049	2005	Nigeria	95	95
				Gladysdale	1953	Australia	64	71
				16113	2016	Namibia	64	72
				Rita	1987	Cameroon	60	68
				Rita-mut	unpublished data from CIRAD (2006)		22	26
	<i>Mmc</i>	goat	Contagious Agalactiae	PG1 ⁺	<1931	nk	48	59
				GM12	1983	USA	92	89
				95010	1995	France	75	75
				KS1 ⁺	≈1954	USA	12	4
				9231b	1992	France	11	29
Hominis	<i>M.alkalescens</i>	cattle	Pneumonia Arthritis Mastitis Otitis	PG51 ⁺	1961	Australia	7	4
	<i>M. arginini</i>	ubiquist	Opportunistic	5561	2005	Nigeria	8	5
				Pontaurmur	≈1970	France	20	17
	<i>M. ovipneumoniae</i>	sheep	Pneumonia Conjunctivitis Mastitis	Tid ouzou	≈1970	Algeria	13	12
				9139-2/90	1991	Ethiopia	31	35
				Y98 ⁺	≈1971	Australia	63	59
				14811	2007	France	74	74
				PG2 ⁺	1952	Spain	24	30
	<i>M. agalactiae</i>	goat	Contagious Agalactiae	94093-5633	1991	France	30	23
Phytoplasma / Achleplasma	<i>M. bovis</i>	cattle	Pneumonia Mastitis	PG45 ⁺	1962	USA	49	41
				OGER	1975	France	45	45
	<i>M. bovirhinis</i>	cattle	Commensal	MV5	≈1970	France	49	69
				PG43	1965	England	57	32
	<i>A. laidlawii</i>	environment	Commensal	F11513	2017	France	58	53
Phytoplasma / Achleplasma	<i>A. laidlawii</i>	environment	Commensal	PG9 ⁺	<1963	nk	30	31
				PG8	<1963	nk	27	30

^aOverall caseinolytic activity are expressed in percent of activity based on the logarithmic of relative fluorescence unit (RFU) measured whole culture in modified Hayflick's medium.

Mccp: *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* ;

Mmm: *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*;

Mcc: *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*;

Mmc: *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*.

⁺type strain.

nk, not known

Mutant strain names are in bold and underlined

Grey shaded cells correspond to species belonging to the *Mycoplasma mycoides* Cluster (MMC)

Figure 13: **Paper Table 1**: Caseinolytic activity in mycoplasma cultures from species that can be isolated from ruminant lungs. The overall activity was measured twice for at least two strains of thirteen *Mycoplasma* (sub)species which can be isolated from ruminant lungs. Samples of late exponential cultures in rich m-Hayflick's medium were tested with a fluorescent labelled kit. The highest activities were observed for members of the mycoplasma mycoides cluster but also *M. bovirhinis*.

6.2. Assessment of extracellular proteolytic activity.

The extracellular caseinolytic activity of a strain from each of the 8 selected (sub)-species was assessed on milk plates, where proteases diffusing in the agar generate a translucent ring around the culture (Fig. 1). A wide area of milk digestion was observed for Mmc and Mcc strains, although the appearance differed between the two species. For Mmc strains, there was a sharp zone where the milk was completely digested and a wider zone with diffuse digestion. For all other strains, the digestion zone was diffuse with varying diameters. Mccp strains displayed a conspicuous zone of digestion in spite of cultures on solid media being barely visible, while Mmm and *M. bovirhinis* strains induced only a weak digestion. *M. bovis* and *M. ovipneumoniae* strains, as well as the negative control strain of *M. arginini*, did not display any detectable activity (data not shown). This phenotypic test clearly suggests that Mmc, Mcc, Mccp, and, to a much lesser extent, Mmm and *M. bovirhinis* are all able to produce extracellular caseinolytic proteases released from the cell into the environment while *M. ovipneumoniae* and *M. bovis* are not. The extracellular caseinolytic activity of these strains was then confirmed by performing quantitative analysis using the fluorescently-labelled casein assay in culture supernatants. The assay was first applied to cell pellets and supernatants from stationary phase cultures in m-Hayflick medium (Table 2). The supernatants were filtered through 0.1µm pores and no living mycoplasma cells were remaining in the sample. All strains belonging to the MMC (Table 1) exhibited higher caseinolytic activities in the supernatant than in the cell pellet. The opposite was found for the four other strains tested, including *M. bovirhinis*, which showed higher activities in the pellet. It is noteworthy that for *M. ovipneumoniae* and *M. arginini*, the activity was exclusively detected in the cell pellet. In these experimental conditions, only MMC strains seemed to secrete proteases into the culture supernatant.

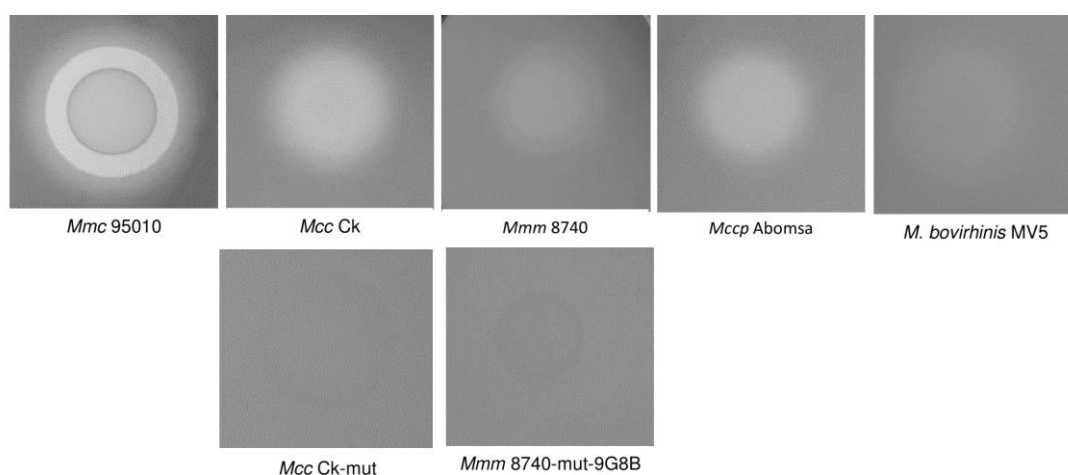


Figure 14: **Paper Fig. 1:** Casein digestion on agar plate (modified Hayflick's medium) supplemented with 0.4% w/v milk. An area of casein digestion was observed for strains producing extracellular caseinolytic proteases. The strongest activity was observed for Mmc strain 95010. The activity observed for Mcc Ck strain was completely abolished in the Ck-mut strain although its culture was clearly visible on the agar surface.

TABLE 2 Caseinolytic activities of selected mycoplasma strains in modified Hayflick's or OPTI-MEM medium

Phylogenetic group	Species and subspecies	Strain ^a	Modified Hayflick's medium ^b				Supplemented opti-MEM medium ^c					
			overall caseinolytic activity		Supernatant activity ^d	cellular activity ^d	Casein digestion on agar plates ^e	Overall caseinolytic activity ^d	Supernatant activity ^d	cellular activity ^d	T0 titer ^f	T16 titer ^f
			assay 1 ^d	assay 2 ^d								
Spiroplasma	<i>Mccp</i>	Abomsa	47	58	46	22	+	38	29	-3	9.3	9.3
	<i>Mcc</i>	Ck ^T	82	90	85	43	+	90	69	24	9.9	10.0
		Ck-mut	40	45	13	19	-	25	13	-1	9.0	9.3
		94157	87	79	59	41	++	94	83	30	9.3	9.6
		16113	64	72	54	26	+	27	1	2	8.7	9.8
		Rita	60	68	56	30	+	11	3	-1	8.8	8.8
		Rita-mut	22	26	5	24	-	7	-8	6	8.5	8.7
		95010	75	75	77	54	++	99	97	23	9.3	9.3
Hominis	<i>M. arginini</i>	Tizi Ouzou	13	12	2	29	-	13	-3	9	9.8	5.6
	<i>M. ovipneumoniae</i>	Y98 ^T	63	59	0	26	-	40	-5	9	8.9	6.7
	<i>M. bovis</i>	Oger	45	45	9	48	-	25	3	2	8.9	7.6
	<i>M. bovirhinis</i>	MV5	49	69	29	76	+	50	49	20	9.6	9.6

^aStrains chosen for extracellular activity research. Ck: California Kid; Mccp: *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* ;

Mmm: *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*; Mcc: *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*; Mmc: *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*.

^bCulture in modified Hayflick's medium.

^cCulture in supplemented opti-MEM medium.

^dActivities are expressed in relative activity percent.

^eCasein digestion on milk agar plate was evaluated by translucent area around bacterial spot and expressed in arbitrary unit based on translucent area observation ("−": no translucent area ; "+": blurred and small translucent area ; "++": sharp and large translucent area, see fig S2).

^fTiter in log₁₀ CFU/ml at 0 h (T0) and after 16 h of incubation (T16) in supplemented opti-MEM medium
Mutant strains names are in bold and underlined characters

Figure 15: **Paper Table 2:** Caseinolytic activities of selected mycoplasma strains in modified Hayflick's or Opti-MEM® medium, in pellet or supernatant. Seven caseinolytic mycoplasma species were selected based on preliminary results in rich modified Hayflick's medium. *M. arginini* was introduced as a negative control. Caseinolytic activity was measured in the pellet and supernatant of mycoplasma suspensions in either rich m-Hayflick or defined protein free Opti-MEM® media. The viability of the cultures was checked by titrations at the beginning and the end of the Opti-MEM® incubation. The highest caseinolytic activity in Opti-MEM® medium was observed for *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* and *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* species. This activity was abolished in the *Mcc* Ck-mut strain, in which the S41 protease gene MCAP_0240 has been mutated.

6.3. Extracellular caseinolytic activity in defined medium.

Studies aiming at the characterization of extracellular components of mycoplasma cultures require the use of chemically defined media devoid of complex supplements such as horse serum and yeast extract, necessary for mycoplasma growth (18, 19). Here, a medium devoid of uncharacterized peptides, Opti-MEM®, may facilitate extracellular protease identification. This medium was able to maintain mycoplasma viability during 16 hours for the majority of the species tested, except for *M. arginini*, *M. ovipneumoniae* and *M. bovis* (Table 2). Within the MMC, *Mcc* and *Mmc* still exhibited a very high caseinolytic activity in Opti-MEM® supernatant, while the activity of *Mccp* declined and that of *Mmm* completely disappeared. This was not due to a loss of viability, as the titers in cell suspensions remained stable until supernatant collection. Contrary to the observations made in rich medium, the caseinolytic activity of *M. bovirhinis* was higher in the supernatant after incubation in a chemically-defined, serum-free medium. As in complex medium, none or negligible caseinolytic activity was detected for *M. arginini*, *M. bovis* and *M. ovipneumoniae* supernatants in Opti-MEM® (Table 2). However, for these last three species the titers of viable cells in the Opti-MEM® suspensions dropped sharply.

6.4. Identification of genes potentially coding for proteases in *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* and *Mycoplasma bovirhinis* species and tandem mass spectrometry analysis.

As the greatest caseinolytic activity in culture supernatants was found in *Mmc* strains, the genome of strain 95010 was chosen as a model for the MMC. Within this genome, 55 genes are predicted to potentially code for proteases (Table 3). Thirty-six were retrieved from the MEROPS database, while 19 additional genes were identified through Mage-datamining. In the closely related subspecies, *Mmm*, this number was reduced to 36, as orthologues were either absent or present in the form of pseudogenes (Table S1 B). Similarly, the number of protease coding genes was drastically reduced for *Mccp* (N=35), as compared to *Mcc* (N=44) (Table S1 A). Only 39 putative protease genes were predicted in the *M. bovirhinis* genome (Table S1 C). So far, our experimental approach was based on phenotypic detection of protease activity, more specifically of caseinolytic activity. For the sake of completeness, we also developed a general proteomic approach consisting in the characterization of all secreted proteases detected in Opti-MEM® supernatants. For this purpose, mycoplasma cell suspensions were incubated as above in Opti-MEM® for 16 hours before being harvested as two separated fractions, i.e. the cell pellet and the supernatant. Both fractions were subjected to MS-MS analysis.

Out of the 55 putative proteases from Mmc-95010 that were identified after genome mining, 35 were detected by tandem mass spectrometry analysis either in the pellet or in the supernatant (Table 3), whereas 18 were detected in *M. bovirhinis*- MV5 samples out of the 39 predicted (Table S1 C). FtsH, which is a membrane bound cytoplasm-oriented, energy dependent AAA+ protease **(20)**, was used as a control. This protease is a universally conserved protein with a well-established localization: in the cytoplasm, presenting two hydrophobic domains anchoring it into the membrane. Its ratio within the pellet samples was quite stable, whatever the mycoplasma strain studied, with a mean of $6.7 \cdot 10^{-3}$ (N=15; min=4.5; max=8.5) and a supernatant/pellet fold-change which varied from 0.04 to 0.7, an indication that FtsH was mostly detected in the cell pellet. This preliminary analysis confirmed that our procedure for sample preparation did not induce a noticeable release of membrane fragments in the supernatant which could be due to cell lysis or vesicle formation **(21)**. By contrast, a number of proteases were highly expressed and detected both in the pellet and in the supernatant (0.5 to 2.5 fold-change). This was notably the case for the endopeptidases such as PepA (1.2 to 2.9), PepF (0.6 to 2.1), PepV (1.8 to 3.3).

Table 3 Predicted protease coding genes and tandem mass spectrometry detection of proteases for *M. mycoides* subsp. *capri* (strain 95010)

Protein	Pellet ratio x10000 (26893)	Supernatant ratio x10000 (11964)	foldchange	Mnemonic	gene name	Annotation (MEROPS and MAGE)
CBW53764.1	50	2	0.0	MLC_0360	ftsH	FtsH-2 peptidase
CBW53797.1	0	0		MLC_0690		family S9 unassigned peptidases
CBW53831.1	1	1		MLC_1030		subfamily S41A non-peptidase homologues
CBW53842.1	1	0		MLC_1140		family S9 unassigned peptidases
CBW53849.1	42	14	0.3	MLC_1210	pyrG	CTP synthetase
CBW53854.1	4	0	0.0	MLC_1260		subfamily S8A unassigned peptidases
CBW53874.1	141	317	0.2	MLC_1460	pepA	family M17 unassigned peptidases
CBW53913.1	56	37	0.6	MLC_1850	pepF	oligopeptidase F
CBW53915.1	84	195	2.3	MLC_1870	pepA	family M17 unassigned peptidases
CBW53985.1	0	397	397.0	MLC_2570		subfamily S41A non-peptidase homologues
CBW54055.1	0	38	38.4	MLC_3270		subfamily S41A non-peptidase homologues
CBW54056.1	3	53	13.2	MLC_3280		subfamily S41A non-peptidase homologues
CBW54067.1	45	165	3.6	MLC_3390	pepQ	subfamily M24B unassigned peptidases
CBW54074.1	0	0		MLC_3460		subfamily C1A unassigned peptidases
CBW54082.1	0	2		MLC_3540	lip1	family S33 unassigned peptidases
CBW54162.1	49	16	0.3	MLC_4340	lon	Lon-A peptidase
CBW54168.1	5	16	2.7	MLC_4400		family C56 non-peptidase homologues
CBW54169.1	0	0		MLC_4410	abc	family C39 unassigned peptidases
CBW54212.1	40	18	0.5	MLC_4840	pepO	family M13 unassigned peptidases
CBW54233.1	50	29	0.6	MLC_5050	lip2	family S33 unassigned peptidases
CBW54234.1	15	0	0.0	MLC_5060	lip2	family S33 unassigned peptidases
CBW54235.1	14	16	1.1	MLC_5070	lip3	family S33 unassigned peptidases
CBW54242.1	12	3	0.2	MLC_5140	nagA	family M38 non-peptidase homologues
CBW54257.1	0	0		MLC_5290		subfamily C1A unassigned peptidases
CBW54260.1	35	66	1.8	MLC_5320	pepV	peptidase V
CBW54267.1	0	0		MLC_5390		family C108 unassigned peptidases
CBW54280.1	0	0		MLC_5520	IspA	family A8 non-peptidase homologues
CBW54282.1	1	0		MLC_5540	pepD	subfamily S9C unassigned peptidases
CBW54326.1	2	0		MLC_5980		subfamily S8A unassigned peptidases
CBW54404.1	6	21	2.9	MLC_6750	map	subfamily M24A unassigned peptidases
CBW54445.1	0	0		MLC_7150		family M79 unassigned peptidases
CBW54490.1	7	0	0.0	MLC_7600	pIdB	family S33 unassigned peptidases
CBW54520.1	6	14	1.9	MLC_7900		esterase EstB
CBW54631.1	0	0		MLC_9010		subfamily M23B non-peptidase homologues
CBW54632.1	0	1		MLC_9020		subfamily M23B non-peptidase homologues
CBW54642.1	3	0	0.0	MLC_9120		subfamily S8A unassigned peptidases
CBW53777.1	22	29	1.3	MLC_0490		Putative peptidase DUF31
CBW53798.1	3	0	0.0	MLC_0700		O sialoglycoprotein endopeptidase
CBW53816.1	0	0		MLC_0880	pepQ	Proline dipeptidase
CBW53878.1	0	0		MLC_1500		Papain-like cysteine peptidasesuperfamily
CBW53944.1	2	1		MLC_2160		Peptidase_M78
CBW53958.1	3	3	0.8	MLC_2300		Inactive homolog of metal-dependent proteases
CBW53994.1	1	10	5.8	MLC_2660		Putative peptidase DUF31
CBW54029.1	0	0		MLC_3010		Peptidase_M78
CBW54081.1	1	8	4.8	MLC_3530		Papain-like cysteine peptidasesuperfamily
CBW54164.1	1	1		MLC_4360		Papain-like cysteine peptidasesuperfamily
CBW54165.1	12	12	0.9	MLC_4370		Papain-like cysteine peptidasesuperfamily
CBW54170.1	1	0		MLC_4420		Metalloprotease catalytic domain superfamily, predicted
CBW54304.1	30	10	0.3	MLC_5760	clpB	ATP dependent Clp protease ATP binding subunit
CBW54318.1	13	11	0.8	MLC_5900		Putative peptidase DUF31; Mycoplasma IgG protease
CBW54320.1	18	44	2.4	MLC_5920		Putative peptidase DUF31; Mycoplasma IgG protease
CBW54322.1	4	0	0.0	MLC_5940		Putative peptidase DUF31; Mycoplasma IgG protease
CBW54324.1	7	14	1.8	MLC_5960		Putative peptidase DUF31; Mycoplasma IgG protease
CBW54539.1	1	1		MLC_8090		Putative peptidase DUF31
CBW54606.1	0	0		MLC_8760		zinc metalloprotease

Dark grey: Mnemonics of genes which are consistently expressed (proportion > 0.001 in either pellet or supernatant)

Light grey: Proteases which proportion is significantly higher in the supernatant.

In brackets: the total number of spectral counts recorded in the sample.

Figure 16: **Paper Table 3:** Predicted protease coding genes and tandem mass spectrometry detection of proteases for *M. mycoides subsp. capri* (strain 95010) Protease coding genes and associated proteins were extracted from the MEROPS database and data-mined from Mmc 95010 genome annotation. An estimation of the protein ratio in the sample, pellet and supernatant, was calculated by dividing the number of specific spectral counts for this protein by the total number of spectral counts for the sample. These proportions were compared by calculating a fold change value (supernatant/pellet). Proteins that are consistently detected (ratio X 10000>10) have their mnemonic highlighted in dark grey. Proteins that are significantly more detected in the supernatant are highlighted in light grey. MLC_2570, coding for an S41 protease (CBW53985.1), was detected only in the supernatant.

6.5. Proteases located preferentially in the supernatant.

To detect which proteases were significantly over-represented in the supernatant, a supernatant versus pellet fold-change distribution analysis was performed for each of the strains. This allowed detecting which fold-change values could be considered as “outlier” as compared to the “normal curve” of the distribution (Fig. S1). Most supernatant/pellet fold-change values were located within the first two intervals (0-0.5; 0.5-1), which corresponded to proteins detected mostly in the pellet sample. For values above one, the curve had a negative exponential shape up to a fold-change value of 5, which was considered as the outlier limit for that example. The curves for all other strains had similar shapes but the upper limit varied slightly (data not shown). This analysis allowed the detection of proteases that were preferentially over-represented in supernatant samples from Mmc 95010 (Table 3) as well as the other members of the MMC and *M. bovirhinis* (Table S1 C). The most striking one was a serine protease (CBW53985.1 and its orthologues; MLC_2570, MCAP_0240, MCCP01_0297), which was almost exclusively detected in the supernatants, fold-change of 397, and not in the pellets from all species of MMC strains except Mmm, in which it was not detected. Another one (CBW54056.1 ; MLC_3280), a predicted lipoprotein with a S41 protease domain, was also detected in 4 out of 6 MMC strains, but with lower fold-change values, 2 to 13. Various other proteases were overrepresented in the supernatant of MMC strains. For Mcc type strain California kid (Ck), two S41 proteases were detected, MCAP_0240, which is orthologue to the Mmc MLC_2570, and MCAP_0329, which is orthologue to the CBW54056.1 ; MLC_3280. The latter was equally detected in the Mcc Ck mutant, suggesting that MCAP_0329 is not involved in the extracellular caseinolytic activity of Mcc. The four proteases that were over-represented in the supernatant of *M. bovirhinis* strain MV5 displayed a DUF31 domain and were analogues of the *Mycoplasma* IgG protease (MIP) evidenced in Mmc (14). These proteases were also detected in Mmc-95010 strain, both in the pellet and in the supernatant, but they were not found over represented in the supernatant of MMC strains. These results fully confirm the data obtained by phenotypic detection, which resulted in the identification of the two main proteases, corresponding to genes MLC_2570 and MBVR141_0224, in Mmc and *M. bovirhinis*, respectively. We were not able to detect any over-represented proteases in Mmm strains (Table S1 B).

Some proteases were indeed detected in the supernatant but with fold-change values that could not be considered as deviating from the standard distribution. By contrast, all the other subspecies and strains of the MMC displayed proteases preferentially secreted into the supernatant.

6.6. Identification of caseinolytic proteases by zymography.

Culture supernatants obtained after incubation in Opti-MEM® were concentrated by lyophilization and analyzed by casein-zymography (Fig. 2). A single band of digestion was observed for Mcc and Mccp with an estimated molecular weight of 55 kDa while two bands were observed for Mmc, one estimated also at 55 kDa, and another estimated at 52 kDa. For Mmm Rita, one of the zymograms showed a faint band at 55 kDa (data not shown) but that was not reproducible and thus not taken into account for further analysis. Tandem mass spectrometry detected specific peptides from orthologues of MLC_2570-peptidase S41 in all the excised bands (Table 4) from strains of the MMC. For Mmc, MLC_2570 represented the majority of spectral counts for both bands of 55 and 52 kDa, while few peptides corresponding to other proteases were also detected (MLC_1460 and MLC_3270). There was a marked difference between the actual size of the zymography band, 55 kDa, and the predicted molecular weight of MLC_2570, 74.5 kDa, which suggests a proteolytic cleavage. The estimated molecular weight of a protein encompassing all amino-acids in-between the N and C terminal detected peptides would be 53.5 kDa (Fig. 3). This indicates that the actual cleavage sites may be located very close to the peptides detected at the extremities. For Mccp, MCCP01_0297 was the only protease detected in the excised band, for which few peptides were detected. In the case of Mcc, the majority of the peptides detected in the sliced 55 kDa band corresponded to another S41 protease, MCAP_0329. However MCAP_0240, the orthologue of MLC_2570 was also detected. As for *M. bovirhinis* MV5 the two bands of 85 and 80 kDa contained specific peptides to MBVR141_0224, a DUF31 putative peptidase.

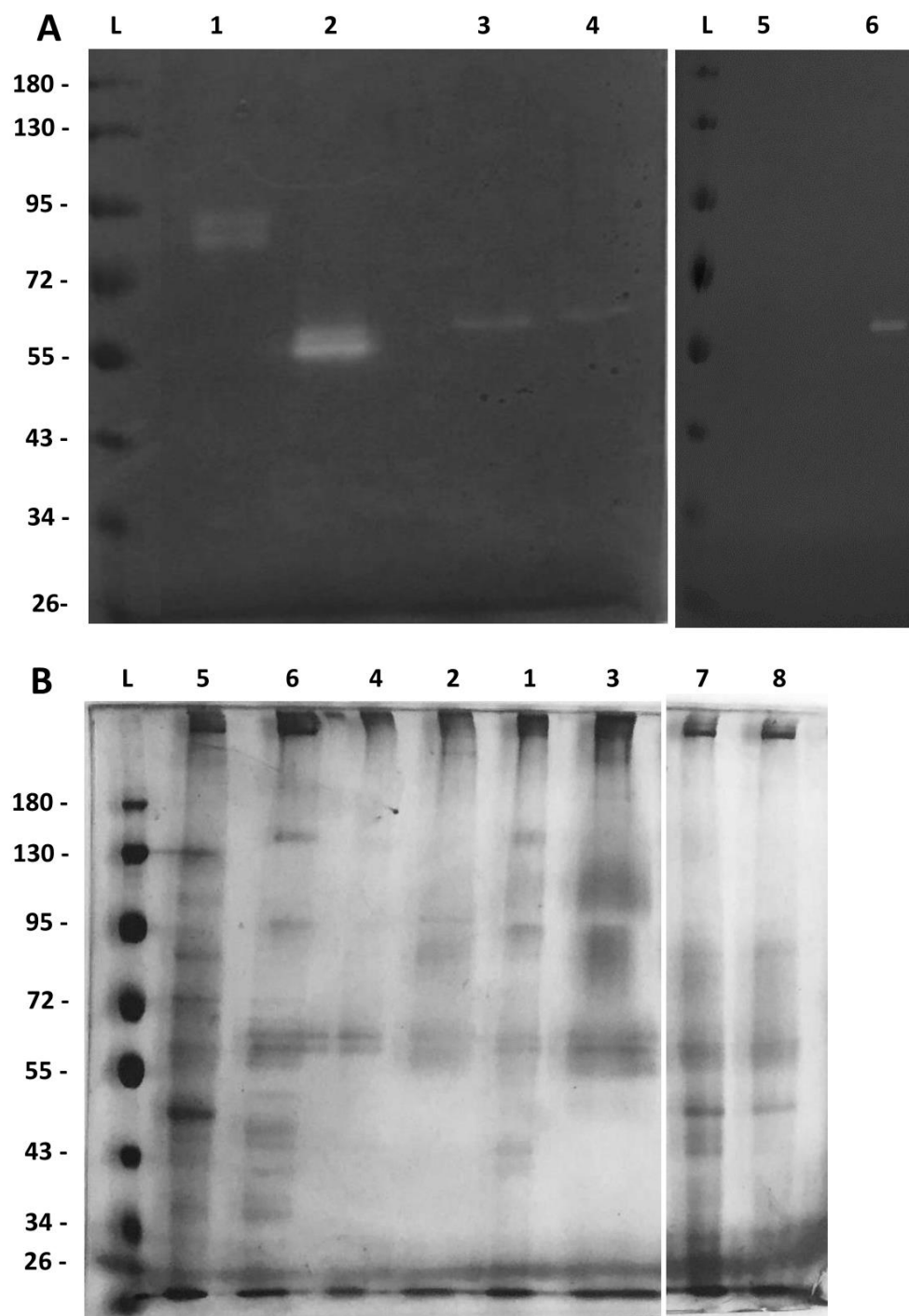


Figure 17: **Paper Fig. 2:** Detection of caseinolytic activity by zymography. Legend: Casein zymogram (A), and SDS-PAGE (B) of supernatant from mycoplasmas incubated in supplemented Opti-MEM®. Lane L : Ladder Page ruler (top to bottom 180, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25 kDa) ; lane 1 (*M. bovirhinis* MV5) ; lane 2 (*Mmc* 95010) ; lane 3 (*Mccp* Abomsa) ; lane 4 (*Mcc* 94157) ; lane 5 (*Mcc* Ck-mut) ; lane 6 (*Mcc* Ck) ; lane 7 (*Mmm* Rita) ; lane 8 (*Mmm* Rita-mut). The discolored bands, showing a caseinolytic activity, were cut and then analyzed by tandem mass spectrometry.

Table 4 Proteins identified by tandem mass spectrometry from caseinolytic zymogram bands

Strains	Mnemonics	accession	Annotation	MW (kDa)	
				55kDa	52kDa
Mmc-95010	MLC_2570	CBW53985.1	CHP, predicted transmembrane protein and tail specific protease	74.5	35
		CBW54005.1	Pyruvate kinase	53.6	9
	MLC_1460 MLC_3270	CBW54529.1	ATP synthase alpha chain	58.1	6
		CBW53874.1	Leucyl aminopeptidase	49.8	0
		CBW54055.1	CHP predicted transmembrane protein, peptidase S41	78.3	4
		CBW54480.1	Phosphoglucosyltransferase	63.8	2
Mcc-Ckid	MCAP_0329 MCAP_0240	ABC01488.1	C-terminal processing peptidase family S41, predicted lipoprotein	71.7	15
		ABC01466.1	membrane protein, peptidase S41	75.5	7
	MCAP_0328	ABC01270.1	pyruvate kinase	53.6	4
		ABC01646.1	membrane protein, putative	206.8	4
		ABC01790.1	membrane protein, peptidase S41	78.9	4
		ABC01474.1	arginine deiminase	46.6	3
Mccp-Abomsa	ABC01292.1	ABC01292.1	ATP synthase F1, alpha subunit	58.0	2
		CDZ17831.1	lipoprotein, putative ribose/galactose ABC transporter substrate-binding protein	60.1	12
	CDZ18073.1 CDZ17832.1 CDZ17891.1 MCCP01_0297	CDZ18073.1	Dihydrolypyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	46.8	10
		CDZ17832.1	putative Ribose/Galactose ABC transporter, ATP binding component	59.4	8
		CDZ17891.1	ATP synthase (subunit alpha, component F1)	58.1	4
		CDZ18087.1	putative conserved membrane protein, peptidase S41	75.5	4
M. bovirhinis-NV5	MBVR141_0224	BBA22185.1	hypothetical protein, putative peptidase (DUF31), predicted lipoprotein	104.0	16
		BBA22123.1	hypothetical protein	87.7	68
		BBA22285.1	hypothetical protein	87.2	34
		BBA22436.1	hypothetical protein	98.5	31
		BBA22541.1	surface protein	80.9	26
		BBA22061.1	hypothetical protein	106.0	15
		BBA22174.1	elongation factor G	77.0	11
		BBA22209.1	phosphotetrase	91.5	7
		BBA22491.1	hypothetical protein, putative peptidase (DUF31), predicted lipoprotein	93.9	5
		BBA22211.1	hypothetical protein, putative peptidase (DUF31)	88.1	4
	MBVR141_0284	BBA22472.1	membrane protein	90.2	4
		BBA22169.1	hypothetical protein	120.0	2

Protein accession highlighted dark grey correspond to predicted proteases
Mnemonics highlighted in light grey correspond to the deduced gene coding for the caseinolytic protease
CHP: conserved hypothetical protein; HP: hypothetical protein, lpp lipoprotein, DUF domain of unknown function

Figure 18: Paper Table 4: Proteins identified by tandem mass spectrometry from caseinolytic zymogram bands Listing of proteins for which specific peptides were detected in the casein zymogram sliced bands. Within the mycoplasma mycoides cluster strains, the S41 serine protease (orthologues of MLC_2570) was constantly detected. This was notably the case for the two 55 and 52 kDa bands obtained in the concentrated supernatant of Mmc-95010. In the supernatant of M. bovirhinis MV5, a predicted DUF31 peptidase (BBA22185.1) represented a high proportion of the detected peptides. This peptidase is an analogue of the Mycoplasma Ig protease demonstrated in Mmc strains.

6.7. Assessment of the extracellular protease activity of predicted S41 peptidases by analysis of mutant strains.

To confirm the activity of MLC_2570 orthologues, two mutant strains with transposon insertions in these orthologues were studied. One was an Mcc strain already described (22) with an insertion in MCAP_0240 (Ck-mut), the other an Mmm mutant previously obtained at CIRAD, with insertion in MSC_0281 (Rita-mut). These insertions had a drastic effect on caseinolytic activities. When grown in rich m Hayflick medium the activity of mutant strains in culture supernatants was negligible or nonexistent, but it was still detectable in the cell pellets (Table 2). When incubated in a defined medium, Ck-mut lost its caseinolytic activity, both in the pellet and in the supernatant, while the parental strain displayed an increased activity, mostly in the supernatant. The results with Rita-mut were less marked, as the parental strain also failed to express a caseinolytic activity after incubation in Opti-MEM®. Concordant results were obtained on milk agar plates, where Mcc and Mmm mutants completely lost their milk digestion properties, while cultures were clearly visible (Fig. 1). Finally, the digested band of 55 kDa that was observed with Mcc Ck in a zymogram performed with the concentrated supernatant was not observed when testing Ck-mut (Fig. 2). These analyses confirmed the role of secreted S41 peptidase MLC_2570 orthologues in casein degradation. The analysis of concentrated supernatants from two independent replicates of Mcc Ck cultures revealed that peptides from 20 predicted surface exposed proteins, lipoproteins or proteins bearing N or C terminal predicted transmembrane regions, were significantly more detected in the supernatant than in cell pellet. The results obtained with three Ck-mut cultures showed that the extracellular secretion profile of 17 out of these 20 proteins was significantly altered (Table 5). Their extracellular secretion was heavily reduced or even abolished and 4 of them could not be detected anymore either in the supernatant or in the cell pellet. The expression and extracellular secretion of 3 of these 20 proteins was unaltered.

Table 5 List of proteins whose exosecretion was evidenced in the original Ck strain and comparison in the Ck-mut strain.

		Ck		Ck1		Ck-mut1		Ck-mut5		Ck-mut50				
Titers (log/ml)		9.4		9.7		9.1		8.9		8.7				
Protein		P	S	P	S	P	S	P	S	P	S	Mnemonic	location	annotation
1	ABC01099.1	1	47	3	72	0	1	0	1	0	0	MCAP_0843	lpp	transglutaminase
	ABC01278.1	0	44	0	70	0	0	0	0	0	0	MCAP_0860	1 TMB	Hypothetical protein
	ABC01319.1	0	25	0	8	0	0	0	0	0	0	MCAP_0863	*	DUF2570
	ABC01807.1	0	100	11	146	0	0	0	0	0	0	MCAP_0864	1 TMB	Topoisomérase?
2	ABC01143.1	0	50	0	47	4	8	3	4	5	0	MCAP_0351	1 TMB	IgG-blocking virulence domain
	ABC01224.1	0	56	0	38	3	19	3	9	1	4	MCAP_0513	lpp	Transglutaminase-like superfamily
	ABC01376.1	0	157	2	271	0	18	0	9	0	0	MCAP_0862	1 TMB	DUF342
	ABC01488.1	0	43	0	35	0	7	0	3	0	0	MCAP_0329	1 TMB	Peptidase S41
	ABC01574.1	8	161	9	209	0	6	0	0	0	0	MCAP_0861	1 TMB	DUF342
	ABC01698.1	4	106	10	80	30	43	19	18	17	5	MCAP_0514	lpp ?	Transglutaminase-like superfamily
	ABC01774.1	0	69	3	57	7	8	5	3	3	0	MCAP_0349	1 TMB	IgG-blocking virulence domain
	ABC01864.1	0	16	0	11	4	4	1	0	0	0	MCAP_0345	1 TMB	IgG-blocking virulence domain
3	ABC01302.1	34	187	20	118	81	36	109	29	172	6	MCAP_0115	1 TMB	RecF/RecN/SMC N terminal domain
	ABC01413.1	15	75	16	65	32	44	34	17	32	3	MCAP_0720	lpp	lppQ
	ABC01444.1	12	59	13	38	22	11	25	2	20	0	MCAP_0348	lpp	peptidase
	ABC01466.1	24	156	68	214	54	28	63	29	76	20	MCAP_0240	2 TMB	Peptidase S41
	ABC01836.1	3	26	5	18	23	0	27	0	16	0	MCAP_0019	1 TMB	Secreted Thousand Residue Frequently Tandem
4	ABC01469.1	0	23	0	19	1	22	7	39	4	17	MCAP_0607	lpp	Transglutaminase-like superfamily
	ABC01669.1	0	13	0	15	0	28	0	11	0	3	MCAP_0399	2 TMB	Hypothetical protein
	ABC01832.1	0	16	1	22	3	26	3	11	1	2	MCAP_0401	2 TMB	Hypothetical protein

lpp: lipoprotein, TMB: transmembrane region, DUF: domain of unknown function, P= pellet, S= supernatant

1: genes whose translation has been abolished

2: genes whose translation and protein exosecretion have been reduced

3: proteins whose exosecretion has been reduced or abolished

4: genes whose translation and protein exosecretion have not been modified

*: This protein is predicted to be 273AA long in the Ck genome. However orthologous genes in Mcc genomes are longer and contain one TMB.

Figure 19: Paper Table 5: List of proteins whose extracellular secretion, in the Ck-mut strain, has been modified as compared to the original Ck strain. This table shows the number of spectral counts detected in the cell pellet and concentrated supernatant of independent cultures of Ck or Ck-mut. The inactivation of MCAP_0240 in the Ck-mut strain had a dramatic effect on the expression of a number of genes (17/20) and the exosecretion of the translated products. Every impacted protein was predicted to be a lipoprotein or possess a TMB region and therefore being a surface exposed protein.

6.8. In silico analysis of serine protease CBW53985.1 (MLC_2570).

Protein CBW53985.1 was by far the most over-represented protease in the supernatants, especially in Mmc strains. It is 651 AA long, possesses two predicted transmembrane domains located at its N and C extremities (positions 7-29 and 627-646) and a predicted signal peptidase I (SPI) site at position 29-30. BLASTP analysis revealed a “C-terminal processing peptidase family S41; peptidase family S41” domain spanning from position 383 to 543, with a high probability (2.7×10^{-23}) and an active site serine at position 477 (Fig. 3). High percentage identities (>78%) were observed with orthologous genes in mycoplasmas of the MMC (Mmm, Mcc, Mccp and *M. leachii*), but also in *M. feriruminatoris* (82.6% identity). Two other proteases of Mmc were detected by BLASTP analysis with a lower percentage identity (49.1% and 44.5% respectively). Both (CBW54055.1; MLC_3270 and CBW53831.1; MLC_1030) had greater sizes, 679 AA and 770 AA respectively, but very similar structures, an SPI site at the N-terminal extremity, an S41 domain and a transmembrane fragment at its C-terminal extremity.

In addition, another Mmc-95010 protein displayed an S41 domain (CBW54056.1; MLC_3280), was predicted to be a lipoprotein and did not display any C-terminal transmembrane fragment, but it yielded lower identity values by BLASTP. Similar mycoplasmal S41 serine proteases were detected by performing a BLASTP analysis excluding the MMC genomes, notably in *M. agalactiae*, *M. alkalescens*, *M. auris*, *M. bovis*, *M. putrefaciens* and *M. salivarium* (Supl. Material). More distantly related S41 bacterial serine proteases were also detected by blasting the conserved S41 domain against the non-redundant database and excluding mycoplasmas. Four S41 serine proteases from *Ruminococcus flavefasciens* (WP_009982655.1; WP_028518726.1; WP_082325677.1 and WP_080693401.1) were detected and had very similar features. Interestingly, a typical LPXTG, sortase associated, cell wall anchor domain was located shortly before the C-terminal transmembrane fragment in all four S41 *Ruminococcus* peptidases.

MKLVKKIGFLSLSAISILGPLAMINNLTTDNLLITKRFLSSSNSNVGLKSYDYINLINN
 KYIPAKINLHDHNGIAYIGVKEFLNSLDGLISFSKIKVRPYQANFYKEKEISYNYKDNK
 VVLNSISKYSNNKTTNYQLEIDSKNKTITVSDNDFFTDIFTFYRRGEEDLNIDFLNTEI
 VNKNKHIVFDLNKYGIEILNDQNDLYLPLVLINQLFLNQSNVQLYFNGQSVNLFAYSRTL
 GKVELLKQLKHSYLNQNHIPAGLKDFQYKYLGFDFHFGYGIKLDKNASYKDLFKKYEKY
 IKADNTTHYLTSRYLIEQLDDLHSSYLLTGYYNKDLETINKAVLKTTTPRSDRFKDIARR
 LSAYYDKELNYKNVYTPDRKTSVISFKNFEANSAFKIEESLKQAQRDGIKNIVLDVSFNS
 GGYLGTAFEIMGFLTDKPFKSYSNPLTKEQKVETIKSRFKKYDFNYVLTSPFSFSAGN
 IFPQLVKDNNVAKVIGFKTAGGASAIQAILPTGDIQLSSNNVLTNKSHQSLEYGVNPD
 ITLGFDPFKQTEKFFASAYIQQAINKDTNTLNSIPATHSSVIEPNYVHELVEQPQPLQLS
 RKTDETEIKNLNNLFSSIKETERKDAYFVLGALGVVISLAISFVITKKLLK*

Figure 20: **Paper Fig. 3:** Identification of peptides detected by tandem mass spectrometry for the predicted S41 protease (CBW53985.1, MLC_2570) of *M. mycoides* subsp. *capri* strain 95010. The N-terminal transmembrane region is shaded dark grey and boxed while the C terminal transmembrane region is shaded light grey and boxed. The predicted S41 superfamily domain is shaded grey and the serine active site shaded darker grey. Within the concentrated supernatant, the tandem mass spectrometry detected specific peptides are underlined.

7. Discussion

Proteases are among the largest family of metabolic enzymes. They operate by a variety of mechanisms and are vital to many aspects of bacterial cell life and pathogenicity (23), such as proteolysis and digestion, cellular respiration, energy storage, transcription, and response to the environment. Proteolytic activity in mycoplasmas was first observed by Longley when using inspissated goat or sheep serum for the growth of an organism causing pleuropneumonia in goats (24). This finding prompted the development of methods to evaluate the proteolytic activities of mycoplasmas (25). Only a few *Mycoplasma* species displayed such activity, including *M. arthritidis*, which digested gelatin (26), *M. bovirhinis*, which digested casein, and *M. mycoides*, which digested gelatin, coagulated serum, and casein (27). Mmc strain 95010 is no exception as 55 protease coding genes were predicted in its genome consisting of 962 CDS. This subspecies can be considered as a model for the mycoplasmas of the MMC. It is highly pathogenic and can induce lesions in a variety of organs but it can also be found as a saprophyte in the ears of normal goats (28, 29). This proves its ability to survive in diverse environments of its caprine host, in spite of a very small genome of 1.15 Megabases. Within these 55 proteases, one appeared prominent, MLC_2570. This protease was detected solely in the supernatant and not in the cell pellet and it was shown to be caseinolytic. Orthologs of this gene were detected within the MMC « *stricto sensu* » but not in closely related mycoplasmas found in ruminants such as *M. cottewii* or *M. yeatsii*, nor in the rest of the Spiroplasma group of species found in insects or plants. Accordingly, this gene belongs to the group of genes that were most probably acquired via horizontal gene transfer (HGT) by the species of the MMC to become successful ruminant pathogens (30). Its closest BLASTP bi-directional best-hits outside the MMC were observed with *M. auris*. Best hits were also detected with *M. alkalescens* and other ruminant pathogens such as *M. agalactiae* and *M. bovis*. In that case, the reciprocal best hits were different protease genes (MLC_1030 and 3270), which seem to indicate that the HGT involved a number of protease genes, highlighting the importance of these enzymes for the convergent evolution towards ruminant colonization within divergent mycoplasma lineages. A hint on the origin of the HGT may be given by the best hits outside mycoplasma genomes, which led to S41 peptidases of *Ruminococcus* species (WP_093044261.1). They share the global architecture of MLC_2570 with a similar length, an N-terminal SPI domain, an S41 family motif, and a C-terminal transmembrane domain. These *Ruminococcus* proteases possess a typical sortase LPXTG motif shortly upstream the C-terminal transmembrane domain.

These sortase motifs are typical of Gram-positive proteins, that are expressed at the cell-surface through a covalent linkage to their cell-wall **(31, 32)**. It is tempting to draw a parallel with a possible secretion mechanism occurring in mycoplasmas of the MMC. However, there are still some clues missing to explain the extracellular secretion of the protease. Neither a signal peptidase I nor a sortase coding gene have been identified in the MMC genomes **(33)**. An alternative cleavage process, based on an endo-proteolysis, may be at stake here. When analysing an Mcc Ck mutant lacking the MLC_2570 orthologue, it was not only the S41 protease whose exosecretion in the spent medium was altered, but also most of the other proteins that were over represented in the supernatant when studying the parental Ck strain. These results suggest that this S41 protease could be involved in the post-translational processing of many mycoplasma surface exposed proteins. Further work is needed to determine the cleavage site of the protease and verify which surface proteins are candidate substrates. In mycoplasmas, the proteolysis of surface exposed proteins seems to be common. This is the case for the MALP-404 lipoprotein of *M. fermentans* **(34)**, with the release of a soluble lipoprotein fragment and the alteration of the surface phenotype leading to a shorter membrane-anchored fragment acting as a Toll-like receptor macrophage-activating lipopeptide. This study had clearly demonstrated that the release of the MALP-404 fragment entailed an extracellular processing, considered as a new mechanism for the “secretion” of hydrophilic proteins in mycoplasmas. This mechanism is widely distributed in mycoplasmas and it has been extensively studied in *M. hyopneumoniae* **(35)**, where endoproteases are responsible for ectodomain shedding **(36)**, with consequences notably on adhesion and plasminogen activation. The post-translational processing of adhesion is not limited to mycoplasmas found in animals as it is also present in the plant pathogen *Spiroplasma citri* where it affects adhesion-related proteins “ScARP” **(11)**. Studying medium-secreted proteins is difficult in mycoplasmas, which need complex and rich media for their growth. This is the reason why we adopted the same strategy that allowed us to characterize secreted polysaccharides **(37)**. Washed mycoplasma cells were incubated into a defined medium, Opti-MEM®, which contains only a very limited amount of proteins consisting of growth factors such as insulin and transferrin. This should allow the mycoplasma to maintain some metabolic activities while obviously not enabling its multiplication. This strategy proved efficient, as medium exported proteins were clearly detected and could be identified by tandem mass spectrometry. However, since this medium did not allow for the multiplication of the mycoplasma, its metabolism may have been modified by this stress through a classical “stringent response”, as seen in other bacteria **(38)**. The RelA/SpoT homologue superfamily, which is involved in the regulation of (p)ppGpp alarmone during stress, may not be present in some mycoplasma species **(39)**.

However, it is present in the MMC and specific spectral counts of RelA were detected in the mycoplasma pellets of all studied strains. In the case of Mmc, the secretion of S41 peptidase in the medium is certainly not specific to the incubation into a defined medium, as a high level of caseinolytic activity was also detected in the highly enriched m-Hayflick spent medium. For some species, such as Mmm, and, to a lesser extent Mccp, the caseinolytic activity was more pronounced in rich medium than in Opti-MEM® medium. This raises the question of the ability of the various mycoplasmas to adapt to stress, a field which is emerging now for these organisms (40, 41). A lower adaptability for Mmm and Mccp would not be surprising, as these species possess degenerate genomes compared to their closest relatives from which they emerged (42) (43). Their reduced gene repertoire may be associated with a restricted ecological niche, the ruminant lungs, and an inability to cope with stress encountered in other body compartments. The genes coding for the S41 peptidases are still functional in Mccp, despite its degenerated genome. This was very noticeable on milk agar, where casein digestion was clearly visible in spite of colony growth being barely noticeable. Expressing and exporting a protease must therefore bring a fitness advantage to these fastidious bacteria. As mycoplasmas are dependent on the supply of peptides for their metabolism, protein digestion by S41 protease could be a first step before further degradations by peptidases (Pep A-F-O-Q-V) and uptake by the oligopeptide ABC transporters. The *in vivo* relevance of these events has yet to be evaluated, notably in terms of virulence. The release of peptides and active proteases could well represent major events in the pathological process by disrupting the delicate environment of the lung alveole. Concomitantly, the antigenic variation that it involves on the cell surface may have profound effects on the interactions with the host innate and adaptative immune responses.

Acknowledgements

We are greatly indebted to Mary Brown from the college of veterinary medicine, Gainesville, Florida USA, who supplied us with the *M. capricolum* subsp. *capricolum* mutant (ctpA::Tn4001t., Ck-mut).

8. Supplémentary material:

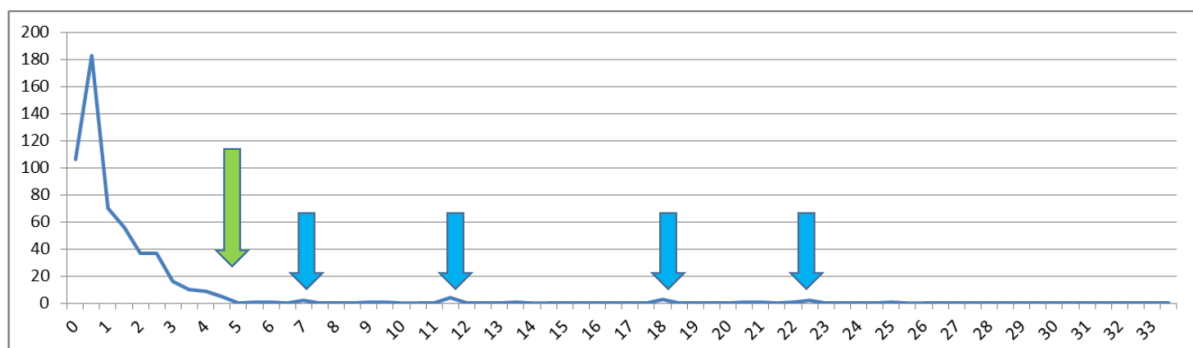


Figure 21: **Paper Fig. S1** distribution of supernatant-pellet ratios for Mmc-95010 MS/MS results. The fold-change value between supernatant and pellet was first calculated for each of the proteins that were detected by tandem mass spectrometry (relative frequency in supernatant/relative frequency in pellet). All values were then analysed by a frequency distribution for values ranging from 0 to 33 and 0,5 intervals (X axis). Values over 33 were not included. A modified value of 1 was substituted to 0 when no spectral counts were detected in the pellet. The Y axis shows the number of proteins within the 0,5 intervals. The curve shows a negative exponential shape for values above 1 (proteins detected more frequently in the supernatant). The green arrow represents the limit for outliers, here 5. Blue arrows pinpoint outlier proteins.

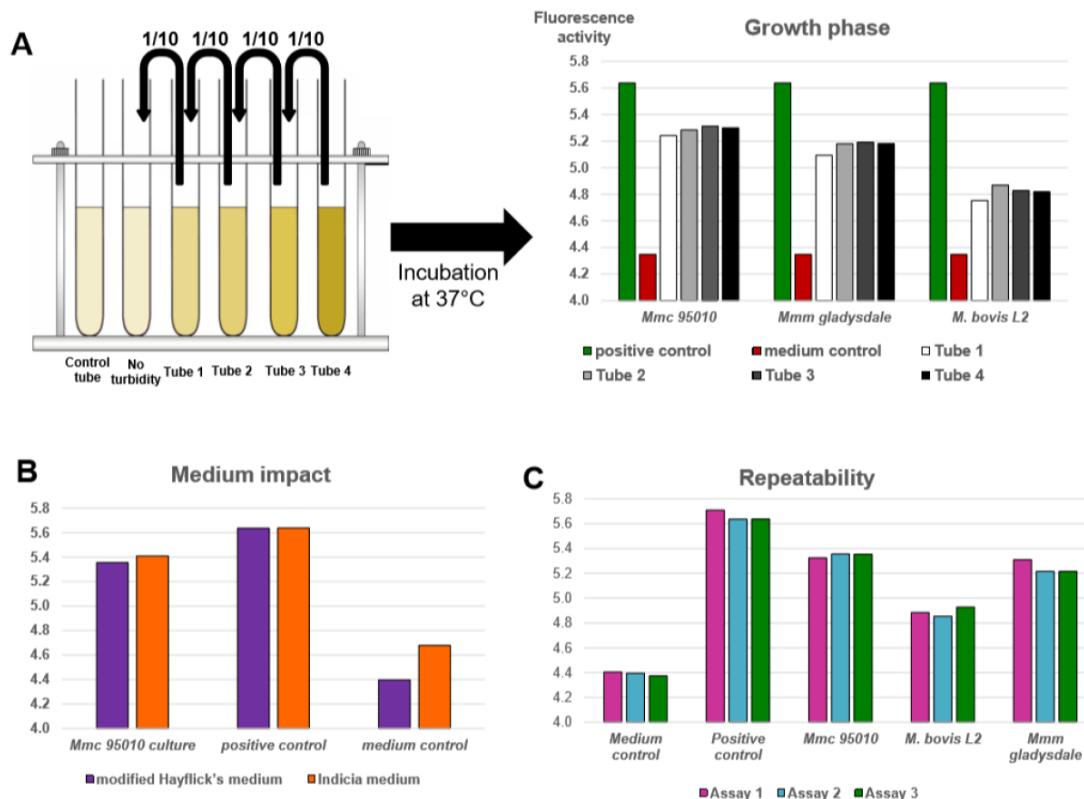


Figure 22: **Paper Fig. S2** Caseinolytic activity measurement robustness evaluation. Caseinolytic activity was assessed on whole cultures of Mmc (strain 95010), Mmm (strain Gladysdale) and M.bovis (strain L2) in modified Hayflick's medium. Each strain was seeded in ten fold dilutions series and incubated until observation of four dilutions showing growth, as evidenced by turbidity of the medium. Tube 1 was the first of the series showing a faint turbidity. The caseinolytic activity of the four cultures were measured and compared with the positive control of the kit and the negative control consisting of an on-seeded medium. Results showed that the caseinolytic activity was stable whatever the length of incubation (A). The possible impact of medium composition was evaluated by comparing the caseinolytic activity of strain Mmc-95010 in two media, the modified Hayflick medium and the Indicia medium (B). There was no significant difference of activity between the two media although modified Hayflick medium yielded a lower background value. Finally, the robustness of the method was evaluated by repeating the measurements on three strains having various caseinolytic activities on three different occasions (C). Results showed that the values obtained were very consistent from one day to another.

A

Mccp-Abome															Mccp-Abome															Mccp-Abome																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
Protein					Pellet					Supernatant					Protein					Pellet					Supernatant					Protein					Pellet					Supernatant					fold change					Macmoaic																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
ratio x10000 (30719)					at ratio x10000 (8005)					foldcha ge					Macmoaic (7323)					Annotatation (MEROPS and MAGE)					ratio x10000 (31885)					Superat ant ratio x10000 (7323)					foldchan ge					ratio x10000 (28169)					Superatant ratio x10000 (3607)					foldchan g					Macmoaic e																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						

C

Predicted protease coding genes and tandem mass spectrometry detection of proteases for <i>M. bovirhinis</i> (strain MV5)						
Protein	ratio x10000 (pellet)	ratio x10000 (supernatant)	foldchange	Mnemonic	gene name	Annotation
BBA22062.1	33	0	0	MBVR141_0	pepF	PepF Oligoendopeptidase F
BBA22075.1	71	60	1	MBVR141_0	pepO	PepO Predicted metalloendopeptidase
BBA22077.1	0	0		MBVR141_0	lepB	LepB Signal peptidase I
BBA22091.1	0	0		MBVR141_0	lspA	LspA lipoprotein signal peptidase
BBA22105.1	0	0		MBVR141_0	map	Map Methionine aminopeptidase
				MBVR141_0180		Peptidase_S8 Subtilase family
BBA22164.1	104	246	2	MBVR141_0	pepB (pep.	PepB Leucyl aminopeptidase
				MBVR141_0214		Peptidase_S8 family domain
BBA22185.1	34	326	10	MBVR141_0224		DUF31 Putative peptidase
	34	239	3	MBVR141_0264		DUF31 Putative peptidase
				MBVR141_0377		DUF31 Putative peptidase
BBA22270.1	24	155	6	MBVR141_0378		DUF31 Putative peptidase
BBA22288.1	3	0	0	MBVR141_0403		proline iminopeptidase
BBA22289.1	42	30	1	MBVR141_0404		peptidase M24 family protein
				MBVR141_0407		DUF31 Putative peptidase
BBA22293.1	1	6	3	MBVR141_0414		proline dipeptidase
BBA22294.1	30	26	1	MBVR141_0	pepB (pep.	PepB Leucyl aminopeptidase
BBA22400.1	22	45	2	MBVR141_0605		FrX Putative aminopeptidase
BBA22412.1	0	0		MBVR141_0625		N-terminal double-glycine peptidase domain
				MBVR141_0683		Peptidase_S8 family domain
				MBVR141_0723		Putative aminopeptidase FrxX
BBA22483.1	31	448	5	MBVR141_0756		DUF31 Putative peptidase
BBA22490.1				MBVR141_0760		DUF31 Putative peptidase
BBA22491.1	3	123	33	MBVR141_0761		DUF31 Putative peptidase
BBA22507.1	5	0	0	MBVR141_0734		FrX Putative aminopeptidase
BBA22542.1	2	118	38	MBVR141_0853		DUF31 Putative peptidase
BBA22552.1	76	4	0	MBVR141_0	lon	ATP-dependent Lon protease
BBA22557.1	0	4	4	MBVR141_0875		Peptidase_S8 family domain
BBA22600.1	0	0		MBVR141_0	clp	ATP-dependent protease ClpP
BBA22067.1	0	0		MBVR141_0020		AprE Serine protease
BBA22069.1	1	0		MBVR141_0022		AprE Serine protease
				MBVR141_0090		AprE Serine protease
BBA22231.1	7	0	0	MBVR141_0314		ThiJ Putative intracellular protease/amidase
BBA22246.1	63	2	0	MBVR141_0	ftsH	HtrB ATP-dependent Zn proteases
BBA22300.1	0	0		MBVR141_0432		serine protease
BBA22308.1	1	2		MBVR141_0445		AprE Serine protease
				MBVR141_0687		AprE Serine protease
BBA22467.1	14	4	0	MBVR141_0707		AprE Serine protease
BBA22541.1	57	317	5	MBVR141_0	ftsN" (paps	FtsN Cell division protein

The mnemonics highlighted in blue correspond to proteins which are detected by mass spectrometry (>4 spectral counts)
The proteins highlighted in green are those which proportion is significantly higher in the supernatant than in the cell pellet.

Figure 23: **Paper Table S1.** : Predicted protease coding genes, expression and fold change within supernatant and pellet fractions. **A:** comparisons within *M. capricolum* (Ck, Ck-mut and Mccp-Abomsa); **B:** comparisons within *M. mycoides* (Mmc 95010, Mmm-Rita and MmmRita-mut); **C:** *M. bovirhinis* MV5

The proteins for which a significant number of specific peptides were detected, either in the pellet or supernatant (ratio X 10000>10) have their mnemonics highlighted blue. Foldchanges that are significant are highlighted green. Values in a sample that differ significantly (>3 or <1/3) from the closest related sample are highlighted orange. For example, the S41 protease ABC01466.1 is detected almost exclusively in the supernatant of Mcc-Ck strain while it is no more detected in Ck-mut.

9. References

1. Nocard E, Roux E, Borrel A, Salimbieni, Dujardin-Beaumetz E. 1898. Le microbe de la péripleurite. Ann Inst Pasteur (Paris) 12:240-262.
2. Westberg J, Persson A, Holmberg A, Goesmann A, Lundeberg J, Johansson KE, Pettersson B, Uhlen M. 2004. The genome sequence of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC type strain PG1T, the causative agent of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). Genome Res 14:221-227.
3. Browning G, F., Noormohammadi A, H., Markham PF. 2014. Identification and characterization of virulence genes in mycoplasmas, p. 77-90. In Browning G, F., Citti C (ed.), Mollicutes, molecular biology and pathogenesis. Caister Academic Press, Norfolk, UK.
4. Pilo P, Frey J, Vilei EM. 2007. Molecular mechanisms of pathogenicity of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. Vet J 174:513-521.
5. Szczepanek SM, Boccaccio M, Pflaum K, Liao X, Geary SJ. 2014. Hydrogen peroxide production from glycerol metabolism is dispensable for virulence of *Mycoplasma gallisepticum* in the tracheas of chickens. Infect Immun 82:4915- 4920.
6. Clyde WA, Jr. 1971. Immunopathology of experimental *Mycoplasma pneumoniae* disease. Infect Immun 4:757-763.
7. Jones HP, Tabor L, Sun X, Woolard MD, Simecka JW. 2002. Depletion of CD8+ T cells exacerbates CD4+ 725 Th cell-associated inflammatory lesions during murine mycoplasma respiratory disease. J Immunol 168:3493-3501.
8. Rosengarten R, Behrens A, Stetefeld A, Heller M, Ahrens M, Sachse K, Yogev D, Kirchhoff H. 1994. Antigen heterogeneity among isolates of *Mycoplasma bovis* is generated by high-frequency variation of diverse membrane surface proteins. Infect Immun 62:5066-5074.
9. Buchenau I, Poumarat F, Grand DL, Linkner H, Rosengarten R, Hewicker- Trautwein M. 2010. Expression of *Mycoplasma bovis* variable surface membrane proteins in the respiratory tract of calves after experimental infection with a clonal variant of *Mycoplasma bovis* type strain PG45. Res Vet Sci 89:223-229.
10. Christodoulides A, Gupta N, Yacoubian V, Maithel N, Parker J, Kelesidis T. 2018. The role of lipoproteins in mycoplasma-mediated immunomodulation. Front Microbiol 9:1682-1682.
11. Dubrana M-P, Guéguénat J, Bertin C, Duret S, Arricau-Bouvery N, Claverol S, Lartigue C, Blanchard A, Renaudin J, Béven L. 2017. Proteolytic post translational processing of adhesins in a pathogenic bacterium. J Mol Biol 429:1889-1902.
12. Tacchi JL, Raymond BBA, Haynes PA, Berry IJ, Widjaja M, Bogema DR, Woolley LK, Jenkins C, Minion FC, Padula MP, Djordjevic SP. 2016. Post translational processing targets functionally diverse proteins in *Mycoplasma hyopneumoniae*. Open Biol 6:150210-150210.

13. Raymond BBA, Djordjevic S. 2015. Exploitation of plasmin(ogen) by bacterial pathogens of veterinary significance. *Vet Microbiol* 178:1-13.
14. Arfi Y, Minder L, Di Primo C, Le Roy A, Ebel C, Coquet L, Claverol S, Vashee S, Jores J, Blanchard A, Sirand-Pugnet P. 2016. MIB–MIP is a mycoplasma system that captures and cleaves immunoglobulin G. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:5406-5411.
15. Raymond BBA, Tacchi JL, Jarocki VM, Minion FC, Padula MP, Djordjevic SP. 2013. P159 from *Mycoplasma hyopneumoniae* binds porcine cilia and heparin and is cleaved in a manner akin to ectodomain shedding. *J Proteome Res* 12:5891-5903.
16. Tacchi JL, Raymond BBA, Jarocki VM, Berry IJ, Padula MP, Djordjevic SP. 2014. Cilium adhesin P216 (MHJ_0493) is a target of ectodomain shedding and aminopeptidase activity on the surface of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Proteome Res* 13:2920-2930.
17. Jarocki VM, Santos J, Tacchi JL, Raymond BBA, Deutscher AT, Jenkins C, Padula MP, Djordjevic SP. 2015. MHJ_0461 is a multifunctional leucine aminopeptidase on the surface of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Open boil* 5:140175-140175.
18. Bertin C, Pau-Roblot C, Courtois J, Manso-Silván L, Thiaucourt F, Tardy F, Le Grand D, Poumarat F, Gaurivaud P. 2013. Characterization of free exopolysaccharides Secreted by *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. *PLoS ONE* 8:e68373.
19. Jordan DS, Daubenspeck JM, Laube AH, Renfrow MB, Dybvig K. 2013. O Linked protein glycosylation in *Mycoplasma*. *Mol Microbiol* 90:10.1111/mmi.12415.
20. Dalbey RE, Wang P, van Dijk JM. 2012. Membrane proteases in the bacterial protein secretion and quality control pathway. *Microbiol Mol Biol Rev* 76:311- 330.
21. Gaurivaud P, Ganter S, Villard A, Manso-Silvan L, Chevret D, Boulé C, Monnet V, Tardy F. 2018. Mycoplasmas are no exception to extracellular vesicles release: Revisiting old concepts. *PloS one* 13:e0208160-e0208160.
22. Allam AB, Reyes L, Assad-Garcia N, Glass JI, Brown MB. 2010. Enhancement of targeted homologous recombination in *Mycoplasma mycoides* subsp. *Capri* by inclusion of heterologous recA. *Appl Environ Microbiol* 76:6951-6954.
23. Culp E, Wright GD. 2016. Bacterial proteases, untapped antimicrobial drug targets. *J Antibiot (Tokyo)* 70:366.
24. Longley EO. 1951. Contagious caprine pleuropneumonia (A study of the disease in Nigeria), vol. N°7. Colonial Research Publication, Stationary Office, London.
25. Freundt EA. 1983. Proteolytic activity, p. 367-371. *In* Razin S, Tully JG (ed.), *Methods in mycoplasmaology*, vol. I. Academic Press, New York.

26. Woolcock PR, Czekalowski JW, Hall DA. 1973. Studies on proteolytic activities of mycoplasmas: The preparation and properties of gelatinolytic enzymes from strains of *Mycoplasma arthritidis*. J Gen Microbiol 78:23-32.
27. Razin S, Freundt EA. 1984. The mycoplasmas, p. 740-793. In Krieg NR, Holt JG (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. I. Williams and Wilkins, Baltimore/London.
28. Cottew GS. 1985. Mycoplasma in ears. Aust Vet J 62:420.
29. Tardy F, Mercier P, Solsona M, Saras E, Poumarat F. 2007. *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* biotype large colony isolates from healthy and diseased goats: Prevalence and typing. Vet Microbiol 121:268-277.
30. Lo W-S, Gasparich GE, Kuo C-H. 2018. Convergent evolution among ruminant-pathogenic Mycoplasma involved extensive gene content changes. Genome Biol Evol 10:2130-2139.
31. Ton-That H, Marraffini LA, Schneewind O. 2004. Protein sorting to the cell wall envelope of Gram-positive bacteria. BBA-mol Cell Res 1694:269-278.
32. Schneewind O, Missiakas D. 2019. Sortases, surface proteins, and their roles in Staphylococcus aureus disease and vaccine development. Microbiol Spectr 7:10.1128/microbiolspec.PSIB-0004-2018.
33. Adeel M, Bum KS. 2019. A comprehensive in silico analysis of sortase superfamily. J Microbiol 57:431-443
34. Davis KL, Wise KS. 2002. Site-specific proteolysis of the MALP-404 lipoprotein determines the release of a soluble selective lipoprotein-associated motif-containing fragment and alteration of the surface phenotype of *Mycoplasma fermentans*. Infect Immun 70:1129-1135.
35. Berry IJ, Jarocki VM, Tacchi JL, Raymond BBA, Widjaja M, Padula MP, Djordjevic SP. 2017. N-terminomics identifies widespread endoproteolysis and novel methionine excision in a genome-reduced bacterial pathogen. Sci Rep 7:11063-11063.
36. Jarocki VM, Tacchi JL, Djordjevic SP. 2015. Non-proteolytic functions of microbial proteases increase pathological complexity. Proteomics 15:1075- 1088.
37. Bertin C, Pau-Roblot C, Courtois J, Manso-Silván L, Tardy F, Poumarat F, Citti C, Sirand-Pugnet P, Gaurivaud P, Thiaucourt F. 2015. Highly dynamic genomic loci drive the synthesis of two types of capsular or secreted polysaccharides within the Mycoplasma mycoides cluster. Appl Environ Microbiol 81:676-687.
38. Pulschen AA, Sastre DE, Machinandiarena F, Crotta Asis A, Albanesi D, de Mendoza D, Gueiros-Filho FJ. 2017. The stringent response plays a key role in *Bacillus subtilis* survival of fatty acid starvation. Mol Microbiol 103:698-712.

39. Atkinson GC, Tenson T, Hauryliuk V. 2011. The RelA/SpoT homolog (RSH) superfamily: distribution and functional evolution of ppGpp synthetases and hydrolases across the tree of life. *PloS one* 6:e23479-e23479.
40. Galperin MY. 2018. What bacteria want. *Environ Microbiol* 20:4221-4229.
41. Beier LS, Siqueira FM, Schrank IS. 2018. Evaluation of growth and gene expression of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* in defined medium. *Mol Biol Rep* 45:2469-2479.
42. Thiaucourt F, Manso-Silvan L, Woubit S, Barbe V, Vacherie B, Jacob D, Breton M, Dupuy V, Lomenech AM, Blanchard A, Sirand-Pugnet P. 2011. *Mycoplasma mycoides*, from “*mycoides* Small Colony” to “*capri*”. A microevolutionary perspective. *BMC genomics* 12:114.
43. Dupuy V, Thiaucourt F. 2014. Complete Genome Sequence of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* Strain 9231-Abomsa. *Genome Announcements* 2.
44. Bonnefois T, Vernerey M-S, Rodrigues V, Totté P, Puech C, Ripoll C, Thiaucourt F, Manso-Silván L. 2016. Development of fluorescence expression tools to study host-mycoplasma interactions and validation in two distant mycoplasma clades. *J Biotechnol* 236:35-44.
45. Hartmann EM, Allain F, Gaillard J-C, Pible O, Armengaud J. 2014. Taking the shortcut for high-throughput shotgun proteomic analysis of bacteria, p. 275-285. *In* Vergunst AC, O'Callaghan D (ed.), *Host-Bacteria Interactions: Methods and Protocols*. Springer New York, New York, NY.
46. Klein G, Mathé C, Biola-Clier M, Devineau S, Drouineau E, Hatem E, Marichal L, Alonso B, Gaillard J-C, Lagniel G, Armengaud J, Carrière M, Chédin S, Boulard Y, Pin S, Renault J-P, Aude J-C, Labarre J. 2016. RNA-binding proteins are a major target of silica nanoparticles in cell extracts. *Nanotoxicology* 10:1555-1564.

10. Résultats complémentaires :

10.1. Hypothèses sur les cibles de la protéase S41.

La protéase MCAP_0240 chez *Mcc* est extracellulaire, capable de dégrader la caséine et serait impliquée dans un phénomène de protéolyse de surface. Cette protéase pourrait être impliquée dans la dégradation de substrat chez l'hôte. Nous avons recherché les cibles potentielles de cette protéase et plus particulièrement ses propriétés hémolitique et fibrinolytique, tout en ayant conscience que ce rôle sera une piste à vérifier avec une protéine purifiée. Nous avons pour cela utilisé une approche similaire à celle employée pour démontrer l'activité caséinolytique extracellulaire sur gélose, consistant en la production de gélose à fibrine ou l'utilisation de gélose au sang.

10.1.1. **Activité hémolitique :**

En milieu PPLO (1,4% (w/v) de bouillon pour mycoplasme ; 1% (w/v) de tryptose ; 0,3% (w/v) d'extrait de levure ; 0,1% (w/v) de glucose ; ajusté à pH 7,6). Vingt microlitres d'une culture mycoplasmaïque de *Mmc* GM12, *Mcc* Ck ou *Mcc* Ck-mut (mutant généré par mutagenèse aléatoire grâce à l'insertion du transposon Tn4001t dans le gène *ctpA* codant pour la protéine MCAP_0240) ont été déposés sur géloses COS (Biomerieux) composées d'une gélose Columbia supplémentée avec 5% de sang de mouton défibriné. L'activité hémolitique est estimée après incubation à 37°C sous 5% de CO₂ et observation d'une zone translucide autour du dépôt de la colonie.

10.1.2. **Dégradation de la fibrine :**

Dix microlitres de surnageant de culture de *Mmc* GM12, *Mcc* Ck ou *Mcc* Ck-mut en milieu OptiMEM (Opti-MEM®+GlutaMAX® supplémenté avec 0,4% (m/v) de pyruvate ; 0,02% (m/v) d'ADN et 1 g/L d'amoxicilline) ont été déposés sur une gélose à fibrine composée de 0,6% (m/v) d'agarose dissous 30 minutes à 90°C, et 0,25% (m/v) de fibrinogène dissous à 37°C dans du PBS 1X (10 mM phosphate, 150 mM NaCl à pH7,8). Après dissolution, les solutions d'agarose et de fibrinogène sont placées à 45°C environ 20 minutes avant d'être mélangées. Une fois la gélose coulée, 1 unité/ml de thrombine est ajoutée et répartie dans la gélose puis celle-ci est prise en masse durant 30 minutes.

10.1.3. Dissolution de la fibrine :

Une gélose fibrine - PPLO a été préparée et est constituée de 0,4% (m/v) de fibrinogène issu de plasma bovin dilué dans du PBS 1X. A la solution de fibrinogène sont ajoutés 60% (v/v) de milieu PPLO et 0,05% (m/v) de CaCl_2 . Le mélange est coulé dans une boîte de Pétri puis 5 unités/ml de thrombine, issues de plasma bovin, sont ajoutées et homogénéisées rapidement. La gélose est laissée 1h à température ambiante pour la prise en masse. Puis, 2 μl de culture sont déposés sur la gélose et celle-ci est incubée à 37°C, 5 jours, sous 5% de CO_2 .

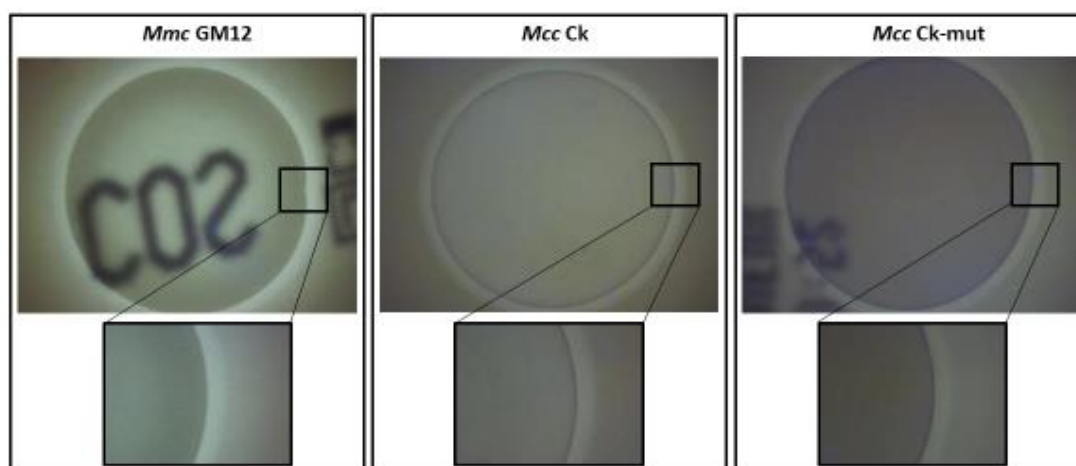


Figure 24: **Activité hémolytique de Mmc et Mcc.** Des zoom x2 des photos du haut sont présentés dans les encadrés noirs. A gauche : Mmc GM12. Au centre : Mcc Ck. A droite : Mcc Ck-mut (muté pour la protéase MCAP_0240).

On remarque, à partir des dépôts sur gélose au sang (Figure 24), qu'une zone de digestion diffuse est observée pour les trois souches et notamment pour la souche mutée pour la peptidase S41, MCAP_0240 (Mcc Ck-mut). Il semblerait donc que la mutation de la protéase S41 n'impacte pas l'activité hémolytique, suggérant que cette protéase n'induit pas à elle seule cette activité.

Nous nous sommes donc intéressés à un autre substrat qui pourrait être rencontré dans un contexte de mycoplasmoses, la fibrine ou son précurseur : le fibrinogène. En effet, une des mycoplasmoses majeures, la péripneumonie contagieuse bovine, est caractérisée par une inflammation exsudative séro-fibrineuse de la plèvre et des poumons. Nous avons donc cherché à évaluer (1) si la protéase MCAP_0240 participait à la dégradation de la fibrine et (2) si elle participait à la digestion de caillots.

Nous avons réalisé des gélases constituées de fibrine et d'agarose auxquelles du surnageant de culture (de *Mmc* GM12, *Mcc* Ck et *Mcc* Ck-mut) a été déposé afin d'évaluer la capacité de digestion de la fibrine par les protéases extracellulaires (Figure 25).

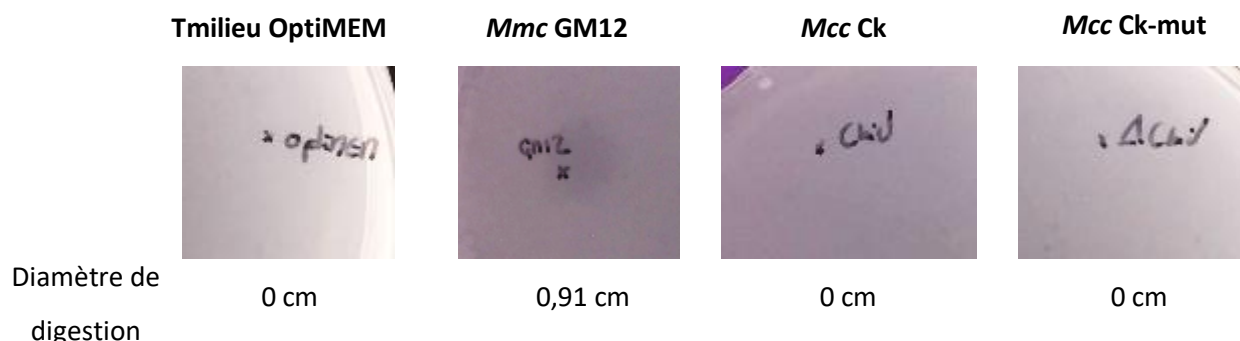


Figure 25: **Dégradation de la fibrine par *Mmc* et *Mcc*.** Du surnageant de culture en milieu OptiMEM est déposé sur gélose constituée d'agar et de fibrine. Tmilieu OptiMEM correspond au témoin négatif constitué uniquement du milieu OptiMEM non inoculé

On observe sur la Figure 25 qu'une zone de digestion transparente est présente au niveau du dépôt du surnageant de *Mmc* GM12 et que cette zone est absente lors du dépôt du milieu OptiMEM non inoculé. Aucune zone de digestion n'est observée pour les souches *Mcc* Ck ou *Mcc* Ck-mut. Dans ces conditions expérimentales, il semblerait que seule la souche GM12 sécrète dans le milieu extracellulaire une protéase capable de digérer la fibrine. Comme nous ne disposons pas d'une protéase MLC_2570 (orthologue de MCAP_0240) purifiée pour *Mmc* GM12, nous ne pouvons pas statuer sur le rôle de cette protéase dans la dégradation de la fibrine. Pour *Mcc* il semblerait qu'avec cette approche, ni la souche parentale ni la souche mutée pour la protéine MCAP_0240 ne puissent dégrader la fibrine. Le fait que la souche parentale de *Mcc* ne présente aucune zone de digestion est un résultat plutôt surprenant puisque d'après l'ouvrage « The mycoplasmas » (Razin et Freundt 1984) *Mcc* est capable de digérer le sérum coagulé tout comme *Mmc*. Comme la digestion de *Mmc* est faible cela suggère que notre approche n'est peut-être pas assez sensible et qu'une approche alternative est nécessaire. Nous avons donc mesuré l'activité fibrinolytique à l'aide de gélases de fibrine. Elles permettent la croissance des mycoplasmes qui vont, s'ils disposent de protéases adéquates, digérer le réseau de fibrine qui est responsable de l'aspect solide de la gélose et entraîner l'apparition d'une zone liquide.

La gélose a été ensemencée avec une culture entière de *Mcc Ck* ou de *Mcc Ck-mut* (Figure 26).

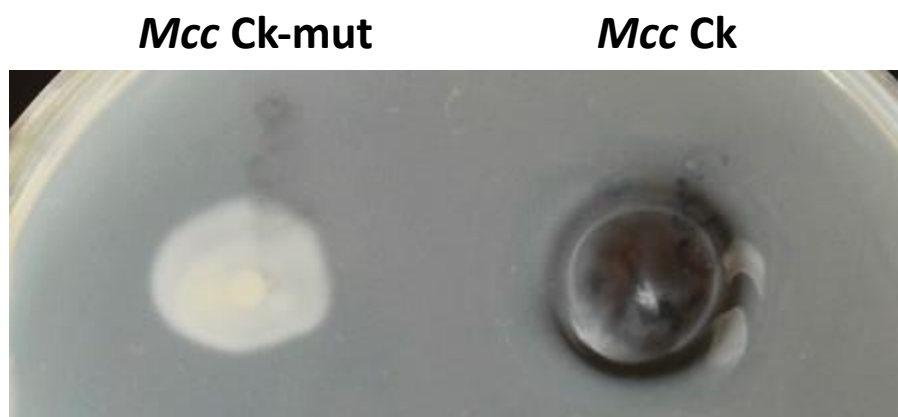


Figure 26: **Digestion du réseau de fibrine par *Mcc Ck* et *Ck-mut*** après dépôt d'une culture entière de *Mcc Ck* et *Mcc Ck-mut* et 5 jours d'incubation à 37°C. Pour plus de clarté, le liquide résultant de la digestion a été enlevé laissant ainsi apparaître un trou dans la gélose.

Nous avons pu observer que *Mcc CK* est bien capable de dégrader le caillot de fibrine, une zone liquide d'un diamètre de 1,2 cm a été mesurée après 5 jours d'incubation au niveau de la zone de dépôt. Ce liquide provient de la dissolution du caillot et la formation de produits de clivage de la fibrine soluble. Chez le mutant *Ck-mut*, le développement de la culture est observé mais aucune zone liquide n'est mesurée suggérant qu'il n'y a pas de digestion du réseau de fibrine. Ce résultat indique que la protéase *MCAP_0240* pourrait participer à la digestion du réseau de fibrine que ce soit de façon directe, par dégradation de la fibrine, ou de façon indirecte, par protéolyse libérant d'autres protéases dégradant le caillot. La production d'une protéase *MCAP_0240* recombinante ou purifiée permettrait de statuer sur son rôle dans la dégradation du caillot de fibrine.

11. Discussion :

Ces travaux ont permis de démontrer qu'une activité caséinolytique peut être mesurée sur des cultures entières (activité cellulaire et/ou extracellulaire) issues de 13 espèces isolées des voies respiratoires des ruminants. Nous avons utilisé comme substrat la caséine qui permet, entre autres, la détection des protéases à sérine, à cystéine et les protéases acides. L'utilisation de caséine marquée est une approche courante de détection et de dosage d'activité protéasique, la plupart des études utilisant de l'azo-caséine (caséine colorée) (Secades et Guijarro 1999, Silva, Mota et al. 2015, Coelho, Saturnino et al. 2016, Gomri, Rico-Diaz et al. 2018). Dans cette étude, nous avons choisi d'utiliser de la caséine fluorescente permettant de détecter d'infimes quantités de protéase puisque la limite de détection est de 10 ng de protéase par échantillon (<http://www.jenabioscience.com>). Nos mesures ont été réalisées sur des cultures en phase stationnaire de croissance et non en phase exponentielle afin de pouvoir comparer les résultats obtenus d'une souche à une autre. En effet, nous avons montré sur 3 espèces (*Mmc*, *Mmm* et *M. bovis*) que l'activité caséinolytique augmentait entre la phase exponentielle et stationnaire et qu'elle restait stable au cours du temps (Figure 22A). A partir des mesures en phase stationnaire, nous avons évalué l'activité caséinolytique sur au moins deux souches par espèce et nous avons réalisé nos mesures en duplicata sur deux cultures indépendantes. Cela nous a permis d'observer que la majorité des mesures sont homogènes entre plusieurs souches d'une même espèce, excepté pour *Mccp*, *M. ovipneumoniae* et *M. bovirhinis*, des espèces dont la culture est délicate. *Mccp* a besoin de milieu plus riche en sérum que d'autres mycoplasmes, *M. ovipneumoniae* et *M. bovirhinis* ont des phases stationnaires plus courtes et entrent en phase de déclin plus rapidement que d'autres espèces, compliquant l'obtention d'une phase stationnaire de croissance reproductible. Une autre hypothèse concernant les variations intra-espèces observées serait que les souches utilisées sont d'origines géographiques différentes et pourraient donc dégrader la caséine différemment. Une légère variation est également observée entre nos répétitions, variation qui pourrait être due à l'utilisation de matériel vivant dont la reproductibilité parfaite est difficile à garantir surtout avec une méthode de détection très sensible.

Grace à l'étude de diverses espèces isolées des voies respiratoires des ruminants, nous avons pu observer que l'activité caséinolytique la plus importante a été mesurée au sein du groupe *M. mycoides* dont toutes les espèces dégradent la caséine, bien que la sous-espèce *Mmm* produise une activité plus faible. Chez des mycoplasmes phylogénétiquement plus éloignés, *M. bovirhinis* et *M. ovipneumoniae*, certaines souches ont de fortes activités caséinolytiques. *M. bovis* possède également une capacité de dégradation de la caséine intermédiaire qui reste plus importante que celle de *M. agalactiae*, *M. putrefaciens*, *M. alkalescens* et *M. arginini*. Ces données sont en accord avec la littérature où une activité de digestion de la caséine avait été mesurée pour *Mmc* et *M. bovirhinis*, (Razin et Freundt 1984) deux espèces présentant de fortes activités avec notre approche. Les données de la littérature attribuent à *Mmm* une activité de dégradation de la caséine plus faible que nous avons également pu mesurer. En revanche, *M. bovis* et *M. ovipneumoniae*, n'étaient pas connus pour avoir une activité caséinolytique tandis qu'avec notre approche nous avons pu en mesurer une. Cela pourrait résulter de l'utilisation d'une approche plus sensible que celle utilisée auparavant ou bien de différences liées aux souches étudiées. Pour les 8 autres espèces que nous avons étudiées au cours de ce chapitre, leur capacité de dégradation de la caséine n'avait pas été recherchée dans l'étude de 1984 et nos mesures permettent donc de les compléter. L'ensemble de ces données nous ont permis de réaliser une pré-sélection et de restreindre le panel d'échantillons initialement composé de 13 espèces à 7 dotées d'une activité caséinolytique sur culture entière (activité cellulaire et extracellulaire) qui seront donc étudiées plus spécifiquement pour la recherche d'activité protéasique extracellulaire.

La présence d'activité caséinolytique extracellulaire a été estimée grâce à l'utilisation de deux approches complémentaires, les géloses au lait et l'activité des surnageants de culture. L'utilisation de gélose au lait permet d'estimer si des protéases sécrétées ont diffusé et dégradé la caséine de la gélose générant un cercle translucide autour du dépôt. Ce type d'approche est utilisé chez d'autres bactéries pour détecter la présence de protéases extracellulaires et a notamment été utilisé pour *Bacillus subtilis* (Vijayaraghavan et SGP. 2013). Ces résultats ont été confirmés par la mesure d'une activité caséinolytique présente dans les surnageants de culture utilisant le kit constitué de caséine fluorescente. Ils ont montré que *Mccp*, *Mcc*, *Mmc* et, dans une moindre mesure, *Mmm* et *M. bovirhinis* sont dotés d'une activité extracellulaire.

Pour réaliser l'identification des protéases extracellulaires, nous avons utilisé une approche similaire à celle employée par Bertin et ses collaborateurs pour identifier les polysaccharides extracellulaires (Bertin, Pau-Roblot et al. 2013) consistant en un transfert en milieu défini. Le milieu défini Opti-MEM a été choisi car il permet de limiter la diversité et la quantité de protéines apportées par le milieu. Celui-ci n'est pas un milieu de culture puisqu'il n'apporte pas tous les composés essentiels au métabolisme des mycoplasmes (ex : acide palmitique, acide oléique, cystéine...) (Yus, Maier et al. 2009) mais semble plutôt être un milieu de survie. Il permet tout de même de mesurer une activité protéolytique et un maintien du titre pour *Mmc*, *Mccp*, *Mmc* et *M. bovirhinis* après une incubation de 16 heures. Pour *Mmm*, une chute de l'activité caséinolytique cellulaire et extracellulaire a été observée dans ce milieu alors que le titre reste constant. Le maintien du titre de *Mmm* pourrait résulter de la présence d'HEPES en OptiMEM contribuant au maintien de la viabilité grâce à un pH stable (Gaurivaud, Lakhdar et al. 2014). En milieu OptiMEM, l'autre sous espèce de *M. mycoides*, *Mmc*, présente une des plus forte activité caséinolytique extracellulaire et a donc été choisie comme modèle pour l'identification, par spectrométrie de masse, des protéases extracellulaires présentes dans le surnageant. Comme pour toutes études du contenu extracellulaire, un des risques est la contamination du surnageant par des protéines issues de lyse cellulaire. L'évaluation de la proportion de protéines présentes dans le culot et le surnageant montre que certaines sont uniquement présentes dans le milieu extracellulaire suggérant qu'elles ne devraient pas résulter d'une lyse cellulaire. De plus, la protéine membranaire FtsH, nous permet de valider nos résultats de par son absence dans le surnageant de culture de *Mmc* suggérant qu'il n'y a pas de contamination par des fragments membranaires (Liu, Hu et al. 2017). Avec cette approche, nous avons donc pu identifier 55 protéines annotées comme protéases. Par comparaison à celles identifiées dans le culot bactérien, nous avons montré que des protéases dotées d'un motif S41 sont présentes en plus grande quantité dans le milieu extracellulaire.

Ces données nous permettent de compléter celles issues des modèles de prédiction *in silico*, reposant sur les annotations de génome, puisque certaines protéases sont détectées dans le milieu extracellulaire, bien qu'elles n'aient pas de motif de sécrétion ou sont prédites comme cytoplasmiques ou membranaires (ex : la peptidase MLC_3390 est prédite dans le cytoplasme mais est identifiée dans le milieu extracellulaire). Les modèles de prédiction de localisation basés sur la présence d'un peptide signal ne tiennent pas compte des activités moonlighting ou de clivage post traductionnel qui pourraient changer la localisation finale des protéines.

En effet, de nombreuses protéines identifiées expérimentalement dans le milieu extracellulaire sont pourtant prédites *in silico* comme membranaires ou cytoplasmiques (Rebollo Couto, Klein et al. 2012, Voros, DeLongchamp et al. 2015, Leal Zimmer, Paludo et al. 2019). Certaines protéines et notamment des enzymes, sont dotées d'activité de type moonlighting et peuvent être localisées aussi bien dans le cytoplasme qu'à la surface membranaire (Robinson, Buchtmann et al. 2013, Jarocki, Santos et al. 2015, Zhao, Zhang et al. 2017, Gao, Bao et al. 2018).

L'identification des protéases extracellulaires par spectrométrie de masse ne nous permet pas de savoir si elles sont actives ou non. Afin d'évaluer si certaines le sont, nous avons analysé les surnageants de culture des espèces par zymographie à caséine qui est une approche classique (Caldas, Cherqui et al. 2002, Pannkuk, Risch et al. 2015). Les zones de digestion observées pour *Mmc*, *Mccp*, *Mcc* se trouvaient au niveau de la zone des 55 kDa (et 52 kDa pour *Mmc*) et à 85 et 80 kDa pour *M. bovirhinis*. Ces zones de digestions ont ensuite été analysées par spectrométrie de masse et ont permis d'identifier des protéases pour les 4 espèces. La protéase de *Mmc*, présente majoritairement dans les deux bandes, est la protéase MLC_2570, dotée d'un motif S41. Pour *Mcc* et *Mccp*, appartenant au même cluster *M. mycoides*, des protéases, MCAP_0240/329/328 et MCCP01_0297, dotées également d'un motif S41, ont été identifiées à partir des zones de digestion sur zymogramme.

Nous avons concentré la suite de nos recherches sur la protéase MLC_2570 qui est majoritairement identifiée dans le surnageant de culture et produite par *Mmc* ainsi que sur la protéase présentant le plus de similarités avec MLC_2570 chez *Mcc*, MCAP_0240. Dans la littérature, la protéase MLC_2570 de *Mmc* avait déjà été étudiée par Allam et ses collaborateurs (Allam, Brown et al. 2012). Cependant, les auteurs ne s'étaient pas intéressés à la localisation extracellulaire de cette protéase, mais plutôt à savoir si sa mutation permettait de modifier le phénotype de *Mmc* pour qu'il ressemble à celui de *Mmm* puisqu'une des caractéristiques différenciant ces deux sous espèces est leur capacité à dégrader la caséine (donnée que nous avons ré-actualisée avec nos recherches). La mutation de la protéase MLC_2570 chez *Mmc* a entraîné une modification du protéome chez la souche mutée ainsi qu'une augmentation de la production d'H₂O₂ par rapport à la souche parentale et une sensibilité plus importante au choc thermique suggérant que cette protéase peut être impliquée dans la réponse au stress (Allam, Brown et al. 2012). Nous n'avons malheureusement pas eu accès à ce mutant mais avons pu bénéficier du mutant chez *Mcc* de l'orthologue de la protéase MLC_2570 c'est-à-dire MCAP_0240 (Ck-mut).

A partir de Ck-mut, nous avons montré que l'activité caséinolytique était perdue et qu'aucune zone translucide sur gélose au lait ou zone de digestion sur zymogramme n'était observée. Ces résultats suggèrent que cette protéase porte l'activité caséinolytique. Par comparaison du protéome extracellulaire, ou exoprotéome, de *Mcc* (Ck) et de son mutant pour la protéase MCAP_0240 (Ck-mut), nous avons montré que la présence de certaines protéines dans le milieu extracellulaire était diminuée chez le mutant. Les protéines impactées sont dotées *in silico* de domaines transmembranaires suggérant que la protéase MCAP_0240 pourrait intervenir dans le clivage de surface et la libération de protéines membranaires dans le milieu extracellulaire. Des activités protéolytiques de surface ont déjà été décrites chez *M. hyopneumoniae*, bien que la protéase en question n'ait pas été identifiée. L'analyse des zones clivées a permis d'envisager qu'une activité aminopeptidasique puisse être à l'origine de ces digestions (Tacchi, Raymond et al. 2014). Afin de connaître plus spécifiquement le rôle de la peptidase MCAP_0240, il faudrait pouvoir la caractériser. Les analyses *in silico* mettent en évidence la présence de deux sites transmembranaires aux extrémités de la protéase mais nous ne savons actuellement pas comment elle est libérée dans le milieu extracellulaire, que ce soit par auto-clivage ou si une autre protéase intervient dans le clivage de surface. De plus, les prédictions *in silico* issues du NCBI « conserved domain » attribuent à cette protéase un rôle de sérine protéase ciblant l'extrémité C-term. Or l'utilisation d'inhibiteurs de protéases à sérine ne nous a pas permis, pour le moment, d'inhiber l'activité protéasique. Ces recherches ont été menées sur le surnageant de culture contenant la protéase en question mais l'utilisation d'une protéase recombinante ou purifiée est nécessaire pour faciliter les recherches d'inhibiteurs, de cofacteurs et pour déterminer le rôle potentiel de cette protéase extracellulaire.

Afin de déterminer ce rôle dans l'interaction avec l'hôte, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux cibles de cette protéase en utilisant le mutant Ck-mut. Sur gélose au sang, nous n'avons pas observé de différence entre la souche parentale et le mutant suggérant que l'activité hémolytique n'est pas entièrement dépendante de cette protéase et donc que d'autres protéases sécrétées ou des hémolysines pourraient participer à cette dégradation. Le dépôt d'une culture entière de *Mcc* Ck sur une gélose de fibrine permettant la croissance du mycoplasme nous a permis d'observer une dissolution du réseau de fibrine, aboutissant à la formation d'une zone liquide transparente pour la souche parentale, qui n'a pas été observée chez le mutant Ck-mut bien que la culture se soit développée. Cela suggère que la mutation induite chez *Mcc* entraîne l'incapacité de celui-ci à dégrader le caillot de fibrine. Nous ne pouvons cependant pas savoir si cette incapacité à dégrader les mailles de la fibrine résulte d'une action directe de la protéase S41 ou si cette protéase participe à l'activation d'autres protéases fibrinolytiques.

Ou encore si le mutant, comme cela a été montré pour le mutant *Mmc* de la protéase S41 par Allam et ses collaborateurs (Allam, Brown et al. 2012), dispose d'un protéome largement modifié, ce qui pourrait résulter en l'inhibition de certaines voies associées à la dégradation de la fibrine. La production d'une protéine recombinante ou purifiée pour cette protéase permettrait de statuer sur le rôle de celle-ci dans l'activité fibrinolytique.

Nos recherches se sont principalement focalisées sur les protéases de la famille S41 car elles sont majoritairement identifiées dans les surnageants de cultures dans lesquels elles sont fonctionnelles et que nous disposons d'un mutant. D'autres protéases peuvent être actives dans le milieu extracellulaire mais elles ne sont peut-être pas mises en évidence par zymographie à caséine et pourront être la cible de futures recherches spécifiques. Parmi les protéines annotées *in silico* comme protéases dans les surnageants de *Mmc*, sont présentes des aminopeptidases (MLC_1870 ; MLC_1460). Des études menées chez un autre mycoplasme, *M. hyopneumoniae* localisent ce type de peptidases à la surface membranaire (Robinson, Buchtmann et al. 2013, Jarocki, Santos et al. 2015). Mais d'autres études proposent que des aminopeptidases soient détectées dans le surnageant de culture d'un mycoplasme phylogénétiquement proche de *M. hyopneumoniae*, *M. flocculare* (Leal Zimmer, Paludo et al. 2019). Une des hypothèses émises par les auteurs serait que ces peptidases soient transportées par des vésicules extracellulaires (VEs). La présence d'activité protéasique a notamment été décrite dans des VEs de *Mannheimia haemolytica* où les auteurs ont montré que l'activité protéasique était différente dans le milieu extracellulaire et dans les VEs et que les protéases des VEs étaient de différentes natures puisqu'inhibées par des inhibiteurs différents (Ramirez Rico, Martinez-Castillo et al. 2017). Des peptidases et notamment des aminopeptidases ont été localisées dans des vésicules extracellulaires d'*A. laidlawii* (Chernov, Mouzykantov et al. 2014). La capacité de formation de VEs ainsi que leur composition seront donc évaluées chez des mycoplasmes des ruminants dans la suite de cette thèse.

PARTIE III

Partie III : La Production de vésicules extracellulaires par le genre *Mycoplasma*.

Chapitre 1 : La vésiculation chez les mycoplasmes, preuve de concept :

1. Contexte et stratégie de recherche :

Les mycoplasmes sont des petites bactéries sans paroi sécrétant des protéines dans le milieu extracellulaire quoique ne disposant pas des voies de sécrétion classiques (Partie I, section 4). Des protéases actives sont pourtant sécrétées par plusieurs espèces/sous-espèces appartenant au cluster *M. mycoides* et pourraient contribuer à libérer, dans le milieu extracellulaire, des protéines ancrées à la membrane par protéolyse (voir Partie II). En plus des protéines de surface, certaines prédites *in silico* comme cytoplasmiques, ont été identifiées dans le milieu extracellulaire de *Mcc*, *M. synoviae*, *M. hyopneumoniae* et *M. flocculare* (Rebollo Couto, Klein et al. 2012, Voros, DeLongchamp et al. 2015, Leal Zimmer, Paludo et al. 2019). Comme cela est proposé pour d'autres modèles bactériens, ces protéines pourraient être exportées dans le milieu extracellulaire par la voie de sécrétion de type 0, utilisant les vésicules extracellulaires (VEs) (Guerrero-Mandujano, Hernandez-Cortez et al. 2017) (Partie I, section 4). Dans la littérature, cette alternative de sécrétion a été envisagée chez les mycoplasmes et notamment chez *M. hyopneumoniae* (Paes, Lorenzatto et al. 2017), même en l'absence de démonstration formelle d'une formation de VEs par ce genre bactérien. D'autres études portant sur un *Mollicutes* opportuniste, *A. laidlawii*, ont mis en évidence par microscopie électronique, la production de vésicules en conditions de stress nutritionnel (diminution de l'apport en sérum) (Chernov, Chernova et al. 2011, Chernov, Chernova et al. 2012, Chernov, Mouzykantov et al. 2014). Ces études pionnières sont à l'origine des travaux de l'Anses Lyon sur la production de VEs chez des *Mollicutes*.

En amont de cette thèse, l'UMR mycoplasmoses des ruminants s'est intéressée à la sécrétion de VEs sur un panel de mycoplasmes isolés des voies respiratoires des ruminants, comme cela avait été réalisé lors de l'étude des activités protéasiques extracellulaires. Ils ont montré que des VEs pouvaient être observées à partir de surnageant de culture de mycoplasmes des ruminants ainsi que d'un mycoplasme humain en condition de stress nutritionnel (Gaurivaud, Ganter et al. 2018). Ce stress nutritionnel est réalisé par diminution de 20% de l'apport en supplément (contenant du sérum) dans le milieu de culture. Ces résultats nous amènent à nous interroger sur le contexte de formation des VEs ainsi qu'à leur composition. Nos objectifs étaient donc de caractériser, dans un premier temps, le contenu membranaire des vésicules. La composition du protéome membranaire des vésicules nous a permis d'évaluer si elles contenaient des protéines participant à l'interaction avec l'hôte mais également de rechercher si une protéine pouvait servir de marqueur permettant la mise au point d'une méthode de quantification relative des VEs. La microscopie électronique couplée au marquage antigénique nous a permis de nous intéresser à la phase de croissance favorisant la production de VEs à savoir si elles étaient plutôt produites en phase exponentielle, stationnaire ou de déclin. Enfin, pour répondre à la définition canonique d'une vésicule extracellulaire nous avons évalué si les vésicules étaient produites activement et si leur formation nécessitait des mycoplasmes viables. Pour cela nous avons volontairement tué des cellules mycoplasmiques afin d'évaluer l'impact de cette mortalité induite sur la production de VEs. Enfin, des criblages de champs de microscopie électronique ont été réalisés afin d'observer des cellules de mycoplasmes en cours de vésiculation.

2. Introduction :

Les VEs sont des structures sphériques non répliquatives nanométriques, dérivant des membranes et qui sont libérées activement dans le milieu extracellulaire par les cellules eucaryotes et procaryotes (Deatherage et Cookson 2012). Depuis leur première observation dans les années 1960 (Bladen et Waters 1963), la majorité des VEs procaryotiques étudiées sont issues de la membrane externe des bactéries Gram - (Kim, Lee et al. 2015). Les VEs issues de bactéries Gram + ont été peu caractérisées jusqu'à présent, bien qu'elles aient été observées par microscopie électronique dans une culture de *Bacillus* dès 1990 (Dorward et Garon 1990). La première caractérisation de la production de VEs par une bactérie Gram+ provient d'une étude pionnière portant sur *Staphylococcus aureus* en 2009 (Lee, Choi et al. 2009) et depuis, des VEs ont été décrites chez diverses espèces Gram+ telles que *Bacillus*, *Streptomyces*, *Listeria*, *Clostridium* et *Streptococcus* (Rivera, Cordero et al. 2010, Schrempf, Koebisch et al. 2011, Lee, Choi et al. 2013, Jiang, Kong et al. 2014, Olaya-Abril, Prados-Rosales et al. 2014). En l'absence d'une membrane externe, les VEs des bactéries Gram+ sont formées à partir de la membrane cytoplasmique. Mais comme leur paroi est composée d'une épaisse couche de peptidoglycane, celle-ci représente certainement une barrière physique qui pourrait gêner le relargage de VEs et expliquer le faible rendement de VEs produites *in vitro* par les bactéries Gram+ (Haurat, Elhenawy et al. 2015).

Au sein du phylum des Gram+, les bactéries appartenant à la classe des *Mollicutes* occupent une place spéciale puisqu'elles ne possèdent pas de paroi et ont une taille cellulaire minimale limitée uniquement par une membrane cytoplasmique. Elles ont évolué à partir d'un ancêtre commun à Gram+ à faible pourcentage en G+C et sont proches d'un point de vue phylogénétique, des *Clostridium* spp. (Ciccarelli, Doerks et al. 2006). Leur proximité génétique avec les bactéries du genre *Clostridium* produisant des VEs (Jiang, Kong et al. 2014) et le fait qu'elles ne possèdent pas de barrière physique de type paroi sont deux raisons suggérant que les *Mollicutes* pourraient produire des VEs. Cela a été effectivement démontré par Chernov et ses collaborateurs en 2011 en utilisant *A. laidlawii* comme modèle (Chernov, Chernova et al. 2011). *A. laidlawii* est un mollicute à l'aspect filamenteux de 0,5µm de large et 2,0 µm de long (Maniloff et Morowitz 1972), répandu dans la nature. Les VEs observées par microscopie électronique, à partir d'une culture placée dans des conditions de stress nutritionnel, avaient une taille de 70 à 120 nm de diamètre (Chernov, Chernova et al. 2011) et contenaient de l'ADN, de l'ARN ainsi que plusieurs protéines dont certaines pourraient être impliquées dans l'interaction *Acholeplasma*-plante (Chernov, Chernova et al. 2011, Chernov, Mouzykantov et al. 2014). Le même groupe a également observé la présence de vésicules à partir d'une culture de *M. gallisepticum* par microscopie à force atomique sans pour autant les caractériser plus précisément (Chernov, Chernova et al. 2011).

Bien qu'elles appartiennent à la même classe, les bactéries du genre *Mycoplasma* diffèrent de celles du genre *Acholeplasma*. Elles ont une forme sphérique et un diamètre compris entre 0,3 et 1,0 μm (Maniloff et Morowitz 1972). Elles sont dotées d'un plus petit génome (513-1358 kpb pour les mycoplasmes contre 1500-1650 kpb pour les acholéplasmes). Par ailleurs, contrairement à celles des acholéplasmes, la membrane des mycoplasmes est riche en cholestérol qui doit leur être apporté via leur environnement de croissance puisqu'ils ne sont pas capables de le synthétiser (Razin et Tully 1970). Enfin, alors que les espèces du genre *Acholeplasma* sont plutôt considérées comme des opportunistes, celles du genre *Mycoplasma* incluent plusieurs espèces pathogènes importantes pour les humains et les animaux. De ce fait, leur capacité à produire des VEs et la composition de celles-ci pourraient jouer un rôle dans leur interaction avec leur hôte animal et leur pathogénie.

Les études menées en amont de ce travail avaient pour objectif d'explorer la production de VEs par plusieurs espèces du genre *Mycoplasma*. Les résultats obtenus et présentés dans ce paragraphe ne sont donc pas issus de mon travail mais ont servi de point de départ à mes recherches. Sept souches représentant 6 (sous)espèces du genre *Mycoplasma* et pathogènes pour l'homme ou les ruminants ont été cultivées sous stress nutritionnel afin d'observer la production de VEs. Il s'agit de (1) *Mmm* (Afadé), (2) *Mmc* (PG3), (3) *Mcc* (L15937), (4) et (5) *M. agalactiae* (L14628 et 5632), (6) *M. fermentans* (PG18) et (7) *M. bovis* (L15762) (Gaurivaud, Ganter et al. 2018). Au sein de l'ordre des *Acholeplasmatales*, la souche PG8 appartenant à l'espèce *A. laidlawii* a été utilisée comme témoin positif puisque c'est pour cette souche que la production de vésicules a été auparavant démontrée (Chernov, Chernova et al. 2011, Chernov, Mouzykantov et al. 2014). Les 8 surnageants de culture concentrés par ultracentrifugation ont révélé par microscopie électronique la présence de formes sphériques compatibles avec une taille vésiculaire pour chacune des (sous)espèces (Figure 27). Les observations du culot vésiculaire d'*A. laidlawii* (PG8) ont permis de valider la procédure expérimentale d'isolement et de concentration des vésicules puisque celles-ci possèdent une taille (50 à 120 nm) similaire à celles observées par Chernov et ses collaborateurs en 2011 (70 à 120 nm) (Chernov, Chernova et al. 2011). Les observations par microscopie électronique ont montré que, dans nos conditions expérimentales, les culots de VEs de *Mmm* et *M. fermentans* étaient les plus denses en VEs.

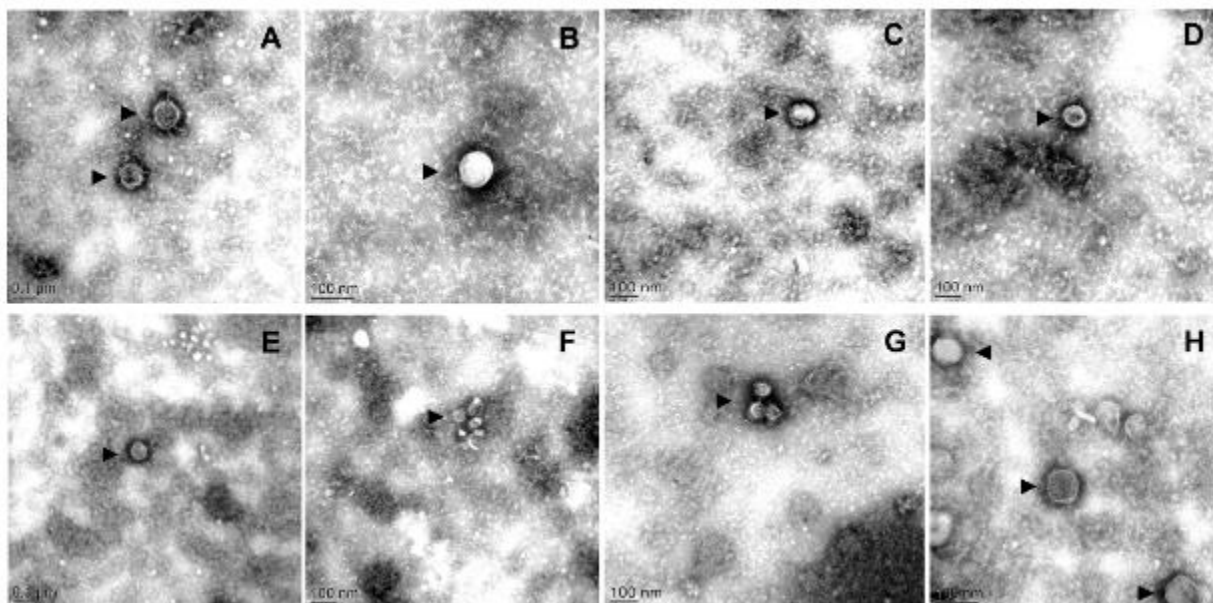


Figure 27: **Observation des VEs de 8 souches.** Photographies par microscopie électronique de vésicules extracellulaires purifiées et colorées négativement (A: *A. laidlawii* PG8; B: *Mmm* Afadé; C: *Mmc* PG3; D: *Mcc* L15937; E: *M. agalactiae* 5632, F: *M. agalactiae* L14628; G: *M. bovis* L15762; H: *M. fermentans* PG18). Les flèches noires représentent des exemples de VEs.

Ces observations ont également montré que le diamètre des VEs variait d'une espèce à l'autre et même d'une souche à l'autre (Figure 28). Les VEs de *M. agalactiae* 5632 possèdent une médiane à 70nm tandis que celles de *M. agalactiae* L14628 montrent une médiane à 50 nm. Les plus grandes vésicules sont observées chez *Mmm*, pouvant mesurer jusqu'à 200 nm, les plus petites sont observées chez *M. bovis* et *M. agalactiae* L14628.

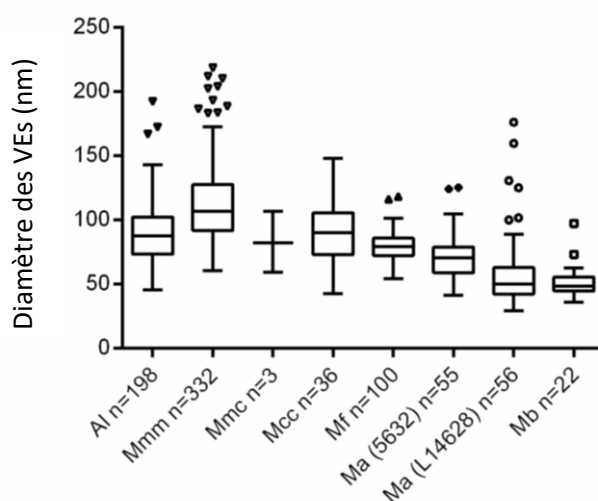


Figure 28: **Diamètre des VEs** mesuré grâce aux observations par microscopie électronique de différentes (sous)espèces (représentation en boîte de Tukey) (Al : *A. laidlawii* PG8; Mmm : *M. mycoides* subsp. *mycoides* Afadé; Mmc : *M. mycoides* subsp. *capri* PG3; Mcc : *M. capricolum* subsp. *capricolum* L15937; Ma : *M. agalactiae*; Mb : *M. bovis* L15762; Mf : *M. fermentans* (PG18).

Tableau 7: **Liste des souches utilisées pour la préparation de vésicules**, leurs principales caractéristiques et le titre associé en milieu m-PPLO après 0, 24, 48 ou 96 h. Les propriétés de chacun des culots de VEs sont présentées pour toutes les souches.

Groupe phylogénétique	(sous)espèce	Souche	Hôte principal	Rôles / signes cliniques	Culture (CFU/ml) en m-PPLO ^a			Vésicules	
					0h	24 h	48 h or 96 h	Densité ^b	Ratio contamination cellulaire ^c
<i>Phytoplasma, Achleplasma</i>	<i>A. laidlawii</i>	PG8 ^T	Vertébré et invertébré	Commensale	2,1+/- 0,6x10 ⁹	1,0+/- 0,8x10 ⁹	(96 h) 3,5+/- 2,4x10 ⁷	+	56/1,8x10 ¹⁰
<i>Spiroplasma</i>	<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i>	Afadé ^d	Bovins	Péripneumonie contagieuse bovine	9,8+/- 1,7x10 ⁸	3,2+/- 0,8x10 ⁹	(96 h) 4,9+/- 4,3x10 ⁷	++	0/2,5x10 ¹⁰
	<i>M. mycoides</i> subsp. <i>capri</i>	PG3 ^T	Caprins	Agalactie contagieuse	8,4+/- 0,4x10 ⁸	4,8+/- 0,9x10 ⁹	(48 h) 3,4+/- 0,0x10 ⁸ (96 h) 9,5+/- 2,2x10 ⁴	+/-	1224/3,4x10 ¹⁰
	<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i>	L15937	Caprins	Agalactie contagieuse	1,6+/- 0,2x10 ⁹	2,3+/- 0,4x10 ⁸	(48 h) 8,6+/- 0,3x10 ⁶ (96 h) 1,1+/- 0,6x10 ⁵	+	0/8,6x10 ⁸
<i>Hominis</i>	<i>M. agalactiae</i>	L14628	Bouquetin des alpes	Pneumonie	3,9+/- 0,2x10 ⁸	3,5+/- 0,8x10 ⁹	(96 h) 5,6+/- 0,3x10 ⁸	+	NC/5,6x10 ¹⁰
		5632	Caprins	Agalactie contagieuse	1,5+/- 0,2x10 ⁹	2,6+/- 0,4x10 ⁸	(96 h) 2,2+/- 0,0x10 ⁸	+	624/1,1x10 ¹¹
	<i>M. fermentans</i>	PG18 ^T	Humains	Associée à diverses maladies et syndromes	2,1+/- 0,3x10 ⁸	4,4+/- 0,6x10 ⁸	(96 h) 2,0+/- 0,0x10 ⁶	+++	0/2,0x10 ⁸
	<i>M. bovis</i>	L15762	Bovins	Maladie du complexe respiratoire bovin	9,3+/- 1,5x10 ⁸	2,0+/- 0,5x10 ⁹	(96 h) 1,9+/- 0,1x10 ⁶	+	1068/1,9x10 ⁸

^a : Les mesures correspondent à une moyenne +/- la déviation standard réalisée sur 3 dénombrements, excepté pour *Mmm* pour qui les données correspondent à la moyenne +/- la déviation standard réalisée sur 3 lots différents et donc sur 9 dénombrements.

^b : La densité des VEs a été estimée par microscopie électronique et répartie en fonction de l'échelle suivante : « +/- », dénombrement <1 EV/ 5µm²; « + », 1-10 EV/ 5µm²; « ++ », 10-100 EV/ 5µm²; « +++ » >100 EV/ 5µm².

^c : Nombre total de CFU dénombrés au sein du culot vésiculaire / Nombre de CFU à 48h ou 96h (CFU/ml x volume de m-PPLO utilisé pour la préparation des VEs).

^d : Le variant non capsulé a été utilisé dans cette étude.

NC, non comptable; ^T, souche type.

Ces premiers résultats obtenus en amont de cette thèse étaient encourageants, mais mettaient d'ores et déjà en évidence des problématiques de purification des vésicules comme le montre le Tableau 7, où 5 prélèvements de vésicules sur 8 contiennent des mycoplasmes viables, nécessitant une amélioration de la méthode de purification en vue de la caractérisation du cargo, c'est-à-dire l'ensemble des molécules composant les VEs (Kalra, Drummen et al. 2016). Mais avant d'aborder cette problématique, le premier objectif de ce travail était de caractériser la composition des VEs de 3 espèces (*Mmm*, *M. agalactiae* et *M. fermentans*) ne présentant pas ou peu de contamination cellulaire en ciblant plus particulièrement les protéines membranaires ce qui permet de limiter la contamination par des agrégats insolubles ainsi que des éléments solubles présents dans le surnageant de culture. Ces identifications permettront d'évaluer si les vésicules sont des modèles intéressants pour la sécrétion et l'interaction avec l'hôte. Puis, notre second objectif était de définir si les vésicules observées étaient issues d'un processus actif. En effet, il était important de déterminer si les VEs mycoplasmiques répondaient à la définition classique d'une vésicule extracellulaire c'est-à-dire qu'elles étaient sécrétées par des bactéries viables. Les recherches *in vitro* ont été menées sur *Mmm* Afadé et plus particulièrement le variant translucide (TR) (Bertin, Pau-Roblot et al. 2013), dépourvu de capsule de polysaccharide et produisant de nombreuses vésicules observées lors de l'étude préliminaire. Nous avons fait l'hypothèse que l'absence de capsule pouvait faciliter le relargage des VEs vers le milieu extracellulaire. Sur ce modèle, nous avons montré que les VEs sont bien produites par des mycoplasmes viables et non le résultat d'une lyse cellulaire de mycoplasmes morts. Les recherches menées en amont de mon travail qui ont porté sur l'universalité de la production de VEs ainsi que celles menées au cours de cette thèse, démontrant la nécessité d'une viabilité cellulaire et caractérisant le contenu membranaire, ont été valorisées au travers d'une publication (Annexe 1).

3. Matériel et méthodes :

3.1. Souches et milieux de culture :

Pour ces recherches, le variant translucide (TR) de la souche *Mmm* Afadé (Bertin, Pau-Roblot et al. 2013), la souche *M. agalactiae* 5632 et la souche *M. fermentans* PG18 ont été utilisés. Le milieu PPLO a été utilisé pour les pré-cultures, il est composé de (1,4% (w/v) de bouillon pour mycoplasme ; 1% (w/v) de tryptose ; 0,3% (w/v) d'extrait de levure ; 0,1% (w/v) de glucose ajusté à pH 7,6 et additionné de 30% de supplément composé de (48% (v/v) de sérum de cheval ; 16% (v/v) de sérum porcin ; 32% (v/v) d'extrait de levure fraîche ; 0,1% (w/v) de nicotinamide adénine dinucléotide et 0,3% (w/v) d'acétate de thallium). Le milieu a également été supplémenté avec 1 g/L d'amoxicilline pour limiter les contaminations. Pour les dénombrements sur milieu gélosé, le milieu PPLO a été supplémenté avec 1% (m/v) d'agar noble.

Un milieu modifié m-PPLO a été utilisé pour la production de VEs afin de réaliser un stress nutritionnel. Ce milieu est réduit en supplément, au lieu des 30% utilisés initialement, 10% sont utilisés, auxquels sont ajoutés 20% de MEM α nucléoside 1X (ThermoFisher). Le supplément a été au préalable ultracentrifugé à 100 000xg pendant 15h à 8°C afin d'éliminer les potentielles vésicules eucaryotes qui seraient présentes dans le sérum.

Un milieu modifié, nommé APSM, a également été utilisé et possède une composition similaire à celle du milieu m-PPLO, excepté qu'à la place du MEM 1X une solution saline tamponnée avec du Tris (2% (w/v) NaCl ; 0,52% (w/v) KCl ; 1,2% (w/v) Tris, pH 7,5 ou 6,5) a été ajoutée. La modification du pH du milieu APSM a été réalisée par addition d'acide chlorhydrique, le milieu a ensuite été stérilisé par filtration sur 0,22 μ m.

3.2. Conditions de cultures :

Les courbes de croissance de la souche Afadé en milieu PPLO et m-PPLO à 37°C ont été réalisées à partir d'une préculture en phase stationnaire diluée afin d'obtenir une concentration initiale en mycoplasmes de 10^3 cfu/ml. Des suivis de croissance par dénombrement au cours du temps ont été réalisés en triplicat par dépôt de 5 μ l de différentes dilutions sur milieu gélosé. Les cultures liquides ou gélosées ont été incubées dans une étuve à 37°C et sous 5% de CO₂.

Pour la production de VEs, une pré-culture a été réalisée en milieu PPLO. Puis, les cellules ont été transférées après centrifugation, à 12 000xg à 20°C durant 30 min, en milieu m-PPLO ou APSM et incubées à 37°C sous 5% de CO₂.

Pour réaliser les tests de viabilité, 3 stress ont été induits. Pour le choc thermique, une culture en phase stationnaire de croissance en milieu m-PPLO a été dénombrée et séparée en deux volumes égaux puis centrifugée à 12 000xg pendant 40 minutes à 18°C. Les culots ont été repris dans du PBS 1X stérile (10 mM phosphate, 150 mM NaCl à pH 7,8) et incubés soit à 60°C, soit à température ambiante, durant 1 heure. Puis ils ont été remis en suspension dans du surnageant issu d'une culture de la souche Afadé en milieu m-PPLO en phase stationnaire, qui a été filtrée et ultracentrifugée, donc ne contenant ni cellules mycoplasmaïques ni VEs et ont été incubés 3 jours à 37°C sous 5% de CO₂.

Pour le stress antibiotique, une culture a été réalisée en milieu m-PPLO, en début de phase stationnaire, la culture a été dénombrée puis 200 µg/ml de gentamicine sont ou non (témoin négatif) ajoutés et la culture est incubée 3 jours à 37°C sous 5% de CO₂.

Enfin, pour le stress pH, une culture a été réalisée en milieu APSM. En début de phase stationnaire, la culture a été séparée en deux et centrifugée à 12 000xg durant 40 minutes à 18°C. L'un des culots a été repris dans du milieu APSM à pH 7,5 et le second dans du milieu APSM à pH 6,5. Les cultures ont ensuite été incubées 3 jours à 37°C sous 5% de CO₂.

3.3. Isolement des VEs :

Pour l'isolement des VEs accumulées en milieu appauvri, les cultures ont été centrifugées à 14 000xg durant 1 h à 4°C. Dix ml de surnageant a ensuite été filtré à 0,2 µm pour les tests de viabilité et 100 ml de surnageant pour la caractérisation du protéome membranaire afin de se placer dans les mêmes conditions expérimentales utilisées dans les études préliminaires menées par l'UMR et publiées dans Plos One. Pour l'expérience de comparaison des stades de croissance, qui avait aussi pour objectif de préparer des lots de vésicules pures selon la méthode de Chernov et ses collaborateurs (Chernov, Mouzykantov et al. 2014), 250 ml de surnageant a été filtré à 0,1 µm. Les VEs présentes dans les surnageants ont ensuite été concentrées par deux approches. La première a consisté en une ultracentrifugation à 100 000xg durant 2 heures à 8°C et a été utilisée pour réaliser les tests de viabilité (réalisés en petit volume de culture et donc ne nécessitant pas de concentration préalable). La seconde, utilisée pour des volumes de culture de plus de 100 ml, a consisté en une concentration des surnageants (4 fois) sur colonnes Vivacell® 70, dotées d'une limite d'exclusion de 100 kDa. Après l'étape de concentration sur colonne, les surnageants ont été ultracentrifugés 90 minutes à 100 000xg à 8°C, cette approche a été utilisée pour la caractérisation du protéome membranaire et l'évaluation de l'impact du stade de croissance.

Après ultracentrifugation, les culots ont été lavés et resuspendus en PBS 1X sauf pour l'évaluation de l'impact du stade de croissance où les différents prélèvements ont été resuspendus en OptiPrep 10% (en PBS 1X).

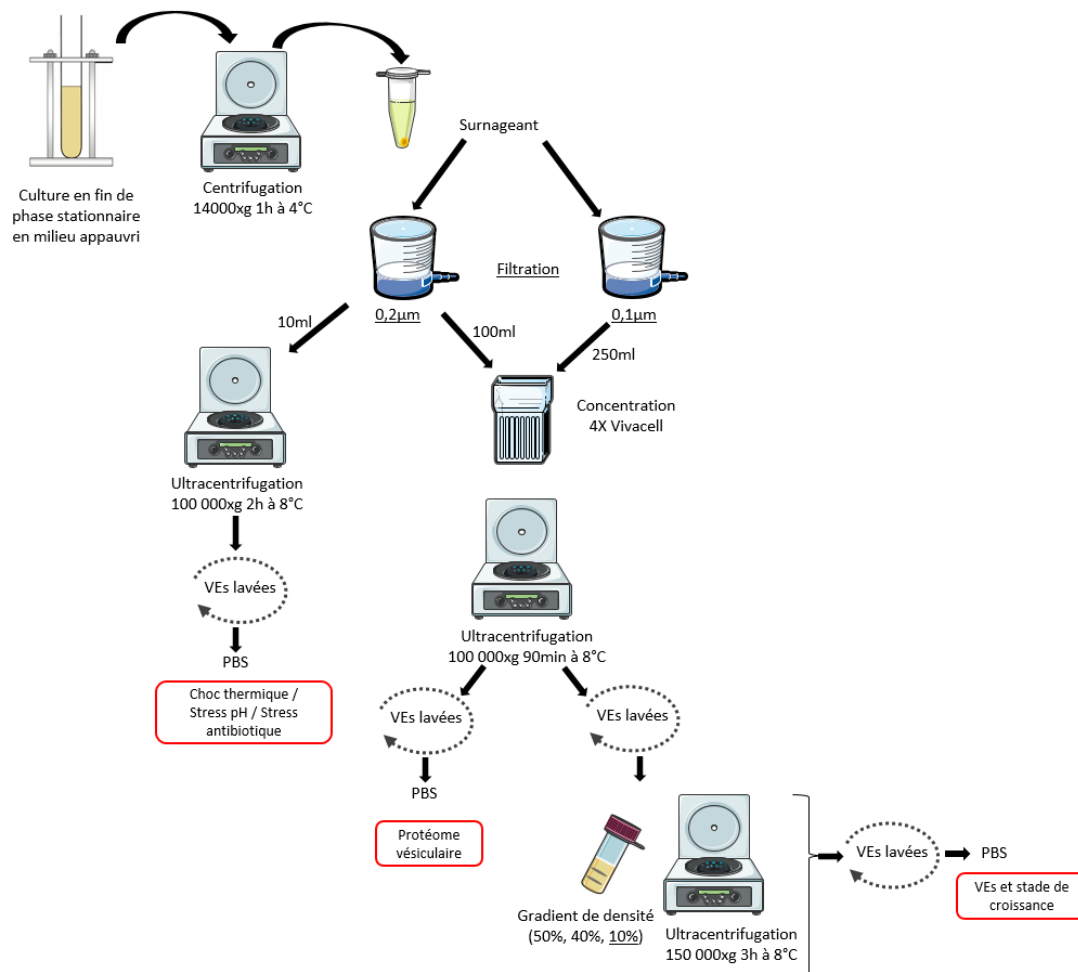


Figure 29: **Stratégie d'étude des vésicules extracellulaires**

3.4. Purifications des VEs :

Pour l'évaluation de l'impact du stade de croissance sur la production de VEs, celles-ci ont été purifiées sur un gradient discontinu constitué d'OptiPrep. Dans ce type de gradient des couches de diverses densités avec un écart de densité non régulier sont déposées les unes sur les autres. Le gradient, selon le protocole de Chernov et collaborateurs (Chernov, Mouzykantov et al. 2014) est constitué de 3 couches (50% ; 40% et 10% en PBS) et les vésicules ont été remises en suspension après ultracentrifugation dans la couche d'OptiPrep 10% en haut du gradient au-dessus des fractions 40% et 50%. Le gradient a été ultracentrifugé 3h à 150 000xg à 8°C. La fine couche opalescente observée dans le gradient a été prélevée et resuspendue dans deux fois son volume de PBS avant d'être ultracentrifugée à 100 000xg durant 1h30 à 4°C. Puis, les vésicules ont été reprises en PBS. L'absence de mycoplasme viable résiduel a été vérifiée par le dépôt d'un quart du volume de resuspension final sur gélose.

3.5. Quantification relative des VEs :

L'anticorps monoclonal 3F3 (Brocchi, Gamba et al. 1993) ciblant la perméase du glucose (MSC_0860, *Mmm* PG1) qui est présente dans le contenu membranaire des vésicules, a été utilisé comme marqueur de la présence de VEs. Deux μL d'isolat de VEs ont été déposés sur membrane de nitrocellulose. Une fois la goutte imprégnée, la membrane a été saturée 30 minutes avec du TBS 1X et 10% de sérum de cheval puis 0,04% (v/v) d'anticorps 3F3 ont été ajoutés et la membrane a été mise sous agitation durant 1h30 à température ambiante. La membrane a été lavée trois fois 3 minutes avec une solution de lavage constituée de TBS 1X et 0,05% (v/v) de tween 20 puis une fois 3 minutes avec du TBS 1X. La membrane a ensuite été incubée 1h30 dans une solution de TBS 1X et 10% de sérum de cheval à laquelle ont été ajoutés 0,2% d'anticorps ciblant les IgG de souris et marqués à la peroxydase. La membrane a été à nouveau lavée 3 fois trois minutes avec une solution de lavage constituée de TBS 1X et 0,05% (v/v) tween 20 puis une fois 3 minutes avec du TBS 1X. Elle a été ensuite révélée dans une solution de révélation constituée de TBS 1X, 20% (w/v) de 4-chloro-1-naphthol et 0,02%(v/v) d'eau oxygénée.

L'intensité du marquage a été évaluée à partir de photographies analysées par le logiciel ImageJ et la fonction « Analyze gels » en comparant les aires marquées.

3.6. Microscopie électronique à transmission:

Cinq μL d'isolat de VEs ou 5 μL d'une culture en phase stationnaire de *Mmm* Afadé variant TR ont été directement déposés sur une grille de carbone FORMVAR pendant 2 minutes, puis l'excès de liquide a été absorbé. Les échantillons ont été recouverts avec une goutte de 1% (w/v) de silicotungstate de sodium pendant 10 s, l'excès est enlevé avec un papier filtre. Après un séchage à l'air libre, les grilles ont été observées à l'aide d'un microscope électronique (Philips CM120) utilisé à 80 kV. Le diamètre des VEs a été estimé à l'aide du logiciel ImageJ.

3.7. Identification des protéines membranaires :

Les protéines membranaires des vésicules ont été extraites grâce à l'utilisation du Triton X-114 pour les souches *Mmm* Afadé, *M. agalactiae* 5632 et *M. fermentans* PG18 selon le protocole décrit par (Bordier 1981). Les protéines présentes dans la phase détergent ont été précipitées par la méthode chloroforme/méthanol (Wessel et Flügge 1984) puis resuspendues dans du tampon Laemmli et portées à ébullition durant 5 minutes. Les échantillons ont été déposés sur gel SDS-PAGE de type Miniprotean Anykd TGX (Bio-Rad). La migration a été effectuée à 150V pendant 5 minutes afin de concentrer les protéines et d'éliminer tous composants pouvant interférer avec l'analyse de spectrométrie de masse. Après migration, le gel a été coloré au bleu de Coomassie Bio-safe selon les instructions du fournisseur (Bio-Rad) puis envoyé à la plateforme PAPPSO (Institut Micalis, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France) pour identification par spectrométrie de masse selon le protocole suivant : des bandes ont été découpées et lavées dans du DTT et de l'iodoacetamide. Une digestion à la trypsine a été réalisée à partir du gel durant la nuit en utilisant 100 ng de trypsine placée dans un tampon bicarbonate 6 h à 37°C. Les peptides ont été extraits avec 5% d'acide formique dans un mélange d'eau/acétonitrile (v/v), puis séchés et resuspendus dans 25 µl d'une solution constituée de 0,1% d'acide formique (v/v) et 2% acétonitrile (v/v). Les analyses par spectrométrie de masse couplées à une chromatographie liquide ont été réalisées sur un système « Ultimate 3000 RSLC » (Dionex) connecté à un orbitrap LTQ (ThermoFisher) doté d'une source nano-electrospray. Les peptides les plus abondants issus des analyses MS/MS ont été recherchés contre la base de données Uniprot (*Mycoplasma (M.) mycoides* subsp. *mycoides* PG1^T (Identifiant Uniprot UP000001016, version 11/10/2013, 978 entrées) / *M. agalactiae* PG2^T (Identifiant Uniprot UP000007065, 11/04/2017, 726 entrées) / *M. fermentans* PG18^T (Identifiant Uniprot UP000006810, 13/05/2017, 1091 entrées) grâce au logiciel X!TandemPipeline (logiciel en accès libre développé par l'équipe PAPPSO, version 3.4.3). Les protéines identifiées ont été filtrées en utilisant un Evaluate < 10⁻⁴ pour les protéines et <0,01 pour les peptides et avec au minimum deux peptides. L'index d'abondance protéique (PAI) a été calculé pour chaque protéine dans tous des échantillons grâce à une méthode de quantification relative basée sur le nombre de spectres. Le PAI, qui reflète l'abondance relative des différentes protéines dans chaque échantillon, est défini comme le nombre de spectres assignés avec un score suffisant qui a été divisé par le nombre de peptides théoriques par protéine. Les protéines membranaires, les lipoprotéines et les protéines transmembranaires ont été identifiées par l'annotation UniProt (<https://www.uniprot.org/>) ainsi que par la prédiction TMHMM2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). Les autres protéines ont été identifiées comme étant cytoplasmiques ou attachées à la membrane en fonction des données fonctionnelles disponibles mais en l'absence de caractéristiques structurales.

4. Résultats :

4.1. Analyses des protéines membranaires des vésicules :

A cette étape du projet, les images de microscopie électronique permettaient d'observer la présence d'agrégats protéiques suggérant que les vésicules isolées n'étaient pas pures et pouvaient être contaminées par les protéines du milieu de culture (Figure 27). C'est pour cette raison que dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au protéome membranaire vésiculaire et non au protéome vésiculaire dans sa globalité. Ces recherches ont été menées sur les préparations vésiculaires de 3 souches produisant suffisamment de vésicules et dont la contamination, par des mycoplasmes viables était nulle ou limitée, *Mmm* Afadé TR, *M. fermentans* PG18 et *M. agalactiae* 5632. Sur ces différents isolats de VEs, les protéines membranaires ont été enrichies grâce au Triton X-114 puis identifiées par spectrométrie de masse. Quatre-vingt-huit protéines ont été identifiées dans le protéome vésiculaire membranaire de *Mmm* Afadé TR, 58 chez *M. agalactiae* 5632 et 258 chez *M. fermentans* PG18. Comme la concentration en vésicules dans les différentes préparations, traités avec le Triton X-114, n'est pas équivalente entre les 3 espèces, l'abondance relative (PAI) n'est pas comparable d'une espèce à l'autre. Parmi les protéines identifiées, certaines pourraient participer à l'interaction entre le mycoplasme et son hôte et sont présentées dans le Tableau 8.

Parmi les protéines membranaires identifiées, de nombreuses lipoprotéines ont été détectées (de 10 à 38% de toutes les protéines identifiées). L'une d'entre elles, la lipoprotéine P37, est commune aux 3 (sous) espèces. Cette lipoprotéine a été décrite comme oncogène chez *M. hyorhina* (Gong, Meng et al. 2008). La lipoprotéine OppA est quant à elle, retrouvée en forte proportion chez *M. agalactiae* et *M. fermentans* et participe chez *M. hominis* à l'apoptose de cellules HeLa (Hopfe et Henrich 2008). D'autres lipoprotéines sont dotées de propriétés antigéniques (ex : LppB) ainsi que de propriétés d'immunomodulation ou d'adhésion. Les lipoprotéines participant à la variation de surface grâce à une variation de phase ainsi qu'à l'adhésion et appartenant à la famille des Vpmas ont été identifiées dans le protéome membranaire des VEs de *M. agalactiae*. La nucléase (A5IYU3) identifiée dans les VEs de *M. agalactiae* est une homologue de la nucléase MBOV_RS02825 qui a été proposée comme participant à la dégradation des « Neutrophil extracellular traps » (cf. Partie I section 3.2.1.5) (Zhang, Zhao et al. 2016). Une lipoprotéine homologue à la lipoprotéine MMCP2_0584 également appelée MIP de *Mmc*, a été identifiée chez *Mmm* (A0A0F2BMU5). Elle participe au clivage d'immunoglobulines G (cf. partie I ; section 3.2.1.2) (Arfi, Minder et al. 2016) et est active en présence de la protéine MIB, non identifiée dans les VEs.

Tableau 8: Liste des protéines membranaires ou associées à la membrane issues des VEs, potentiellement impliquées dans l'interaction hôte-mycoplasme

Protéines		<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> souche Afadé		<i>M. agalactiae</i> souche 5632		<i>M. fermentans</i> souche PG18 ^T		Rôle potentiel
		Uniprot n°	PAI	Uniprot	PAI	Uniprot n°	PAI	
Lipoprotéines	Lipoprotéine p37	A0A0F2BJ67	0,65	ASIY58	0,19	C4XFE4	4,00	Oncogène
	Lipoprotéine LppB et homologues	A0A126SRI9	5,27	ASIZ93 ASIY11 ASIY23	0,66 0,46 0,26	-	-	Antigène
	Lipoprotéine p48 / MALP-404	-	-	F5HGV8	2,41	Q9RGX5	3,71	Immuno-modulation
	Lipoprotéine p80 et homologues	-	-	ASIYU2	1,11	C4XER1	3,31	Antigène
	Oligopeptide transporteur ABC OppA	Nd	Nd	ASIXN9	0,76	C4XEL2	3,48	Apoptotique
	Lipoprotéine nucléase MAG5040	-	-	ASIYU3	0,47	C4XER2	1,53	Antigène, colonisation de l'hôte
	Lipoprotéine acide phosphatase	-	-	ASIYN5	0,88	C4XF87	0,17	Colonisation de l'hôte
	Lipoprotéine p29	-	-	-	-	Q49159	3,15	Antigène, adhésion
	Lipoprotéine variable de surface Y	-	-	F5HDB1	0,64	-	-	Antigène, interaction avec la matrice extracellulaire (MEC)
	Lipoprotéine variable de surface A (vpmaX)	-	-	F5HIG3	0,44	-	-	
	Lipoprotéine variable de surface U (VpmaU)	-	-	F5HEE7	0,27	-	-	
	Lipoprotéine prédite MAG1050	-	-	ASIXP4	0,25	-	-	Colonisation de l'hôte
	Lipoprotéine p40	-	-	F5HEF4	0,17	-	-	Interaction avec la MEC
	Lipoprotéine LppA p72	A0A109WHL4	0,10	-	-	-	-	Antigène, immuno-modulation
	Lipoprotéine (DUF31 domaine)	A0A0F2BMU5	0,05	Nd	Nd	-	-	Clivage d'IgG
Non lipoprotéines	Facteur d'élongation TU	A0A0F2BJ16	1,00	ASIYA9	1,25	C4XEI5	4,41	Interaction avec la MEC, Immuno-modulation
	Protéine chaperonne DnaK (Hsp70)	A0A0F2BNC8	1,00	ASIXT5	0,09	C4XE63	5,05	Immuno-modulation
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	A0A126SR57	0,82	Nd	Nd	C4XF61	1,60	Interaction avec la MEC
	Pyruvate kinase	A0A0X8KSH0	0,32	Nd	Nd	C4XEC6	1,12	
	Lactate déshydrogénase	A0A0F2BK13	0,77	Nd	Nd	C4XELO	0,61	
	Phosphoglycérate mutase	A0A126SQS4	0,12	Nd	Nd	C4XEM3	1,13	
	Transketolase	A0A0F2BGX7	0,06	Nd	Nd	C4XFT7	0,43	
	Perméase du glucose PTS ptsG	A0A0X8KVY6	1,33	-	-	-	-	Antigène, immuno-modulation
	Pyruvate déshydrogénase E1 sous-unité α	A0A0F2BLA7	0,88	-	-	Nd	Nd	Interaction avec la MEC
	Pyruvate déshydrogénase E1 sous-unité β	A0A0F2BL90	0,36	-	-	Nd	Nd	
	Protéine de transport des hexoses phosphates uhpT	Nd	Nd	ASIYT6	0,38	-	-	Colonisation de l'hôte
	NADH oxydase	A0A0F2BLE2	0,40	Nd	Nd	Nd	Nd	Adhésion
	Enolase	A0A126SS16	0,11	Nd	Nd	Nd	Nd	Adhésion
	Leucine aminopeptidase	A0A120KUK9	0,57	Nd	Nd	Nd	Nd	Adhésion

Uniprot n° : numéro d'accension d'Uniprot. PAI : Index d'abondance des protéines. Nd : non détecté dans le protéome. « - », pas de protéines homologues retrouvées dans la (sous) espèce. En gras sont présentées les protéines identifiées chez les 3 espèces.

Des protéines liées à la membrane et qui ne sont pas des lipoprotéines ont également été identifiées. Le facteur d'élongation Ef-Tu est retrouvé dans les 3 préparations vésiculaires. De manière intéressante, Ef-Tu a été également décrite comme la protéine la plus abondante des VEs de *S. aureus* (Lee, Choi et al. 2009). Cette « moonlighting » protéine, en plus de son rôle dans la traduction, interagit avec des composés de l'hôte comme la fibronectine, le plasminogène ou encore le fibrinogène (Widjaja, Harvey et al. 2017, Yu, Wang et al. 2018). D'autres « moonlighting » protéines ont été identifiées dans les VEs de *Mmm*, une NADH oxydase (NOX), une émolase et une leucine aminopeptidase. Des homologues à ces protéines présentent des capacités d'adhésion aux cellules de l'hôte ou à des composés de l'hôte tel que le plasminogène chez *M. bovis* ou *M. hyopneumoniae* (cf. partie I ; section 3.1) (Song, Li et al. 2012, Jarocki, Santos et al. 2015, Zhao, Zhang et al. 2017). La protéine chaperonne Hsp70 (DnaK) a été identifiée dans les protéomes vésiculaires membranaires des 3 espèces. Cette protéine a été associée à la production d'anticorps et à la sécrétion de cytokines chez *M. ovipneumoniae* (Jiang, He et al. 2016) mais possède également des propriétés oncogéniques (Zella, Curreli et al. 2018). Les vésicules de *Mmm* et *M. fermentans* contiennent plusieurs enzymes du métabolisme telles que des lactate déshydrogénase, pyruvate déshydrogénase, pyruvate kinase, phosphoglycérate kinase, et transketolase, également connues pour interagir avec des composés de la matrice extracellulaire (Grundel, Jacobs et al. 2016). Les vésicules de *Mmm* Afadé contiennent également la perméase du glucose MSC_0860 dont l'utilité sera détaillée dans la suite du document.

Pour continuer les recherches, afin de mieux comprendre le contexte de formation de ces structures, nous avons choisi de nous focaliser sur un seul modèle *Mmm* Afadé TR. Ce variant produit beaucoup de vésicules et ne présente pas de contamination cellulaire détectable dans les isolats vésiculaires.

4.2. Vésiculation et phase de croissance :

Les travaux préliminaires sur les vésicules des mycoplasmes ont été réalisés avec le milieu m-PPLO appauvri en supplément (10% au lieu de 30%), afin de réaliser un stress nutritionnel. L'impact de la réduction de la concentration en supplément sur la production de VEs a été évalué sur le modèle *Mmm* Afadé TR en comparant la courbe de croissance en milieu m-PPLO à celle observée en milieu PPLO (Figure 30).

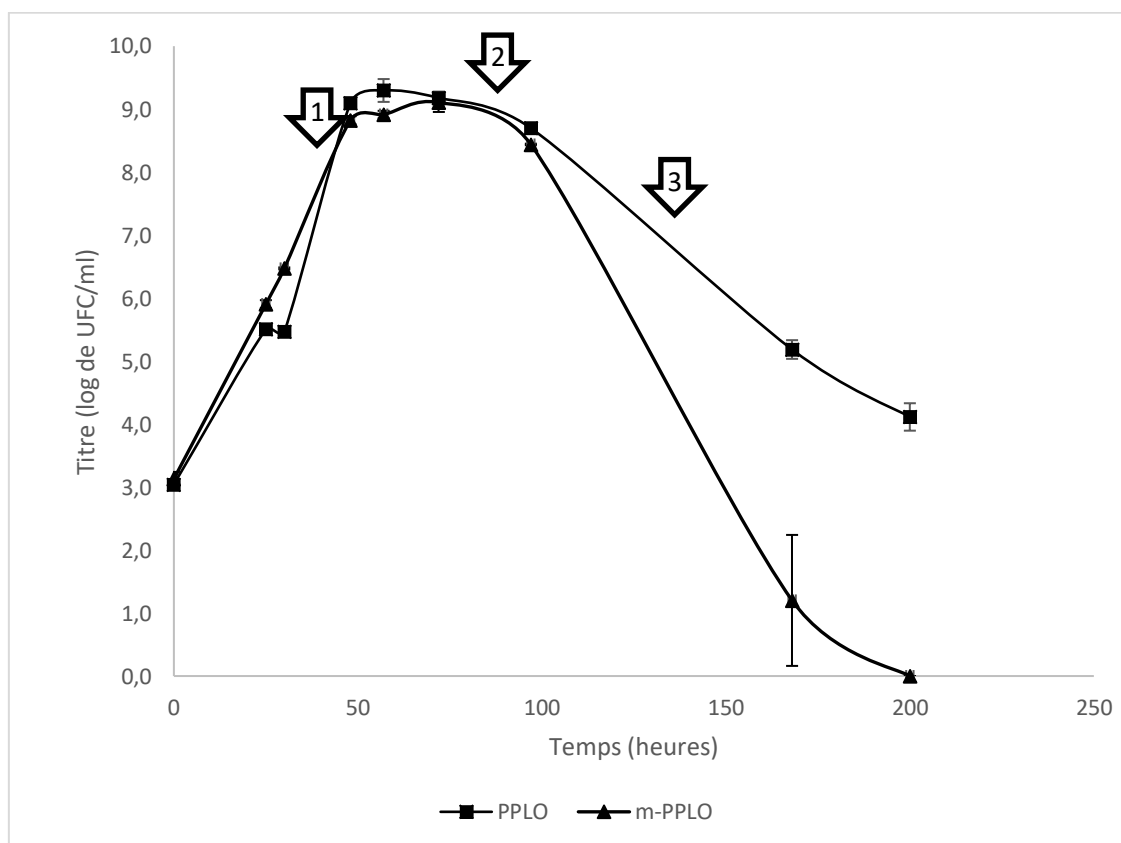


Figure 30 : **Comparaison de la croissance de *Mmm* Afadé TR en milieu PPLO et en milieu m-PPLO.** Les heures sont présentées en abscisse et le titre est exprimé en log d'UFC/ml et est présenté en ordonnée. Les mesures sont réalisées en triplicat biologique. L'écart type correspond à l'écart type du titre mesuré sur les trois cultures indépendantes. Les flèches représentent les différents points de prélèvement (1 : phase exponentielle (+48 h), 2 : phase stationnaire (+96 h) et 3 : phase de déclin (+145 h))

Les phases exponentielles et stationnaires sont en tous points similaires dans les deux milieux. Comme le montre la Figure 30, la survie de *Mmm* est différente en phase de déclin, elle est moindre en milieu m-PPLO qu'en milieu PPLO suggérant qu'un stress nutritionnel impacte la viabilité de ce mycoplasme mais de manière tardive. Afin d'estimer à quel moment de la phase de croissance les vésicules sont produites, elles ont été prélevées en phase exponentielle, en phase stationnaire et en phase de déclin à partir du milieu m-PPLO. Trois réplicas issus de 3 cultures différentes ont été réalisés pour chacun des prélèvements et la méthode d'isolement des VEs a été identique pour les 3 temps de croissance, permettant ainsi la comparaison de l'abondance relative de vésicules produites.

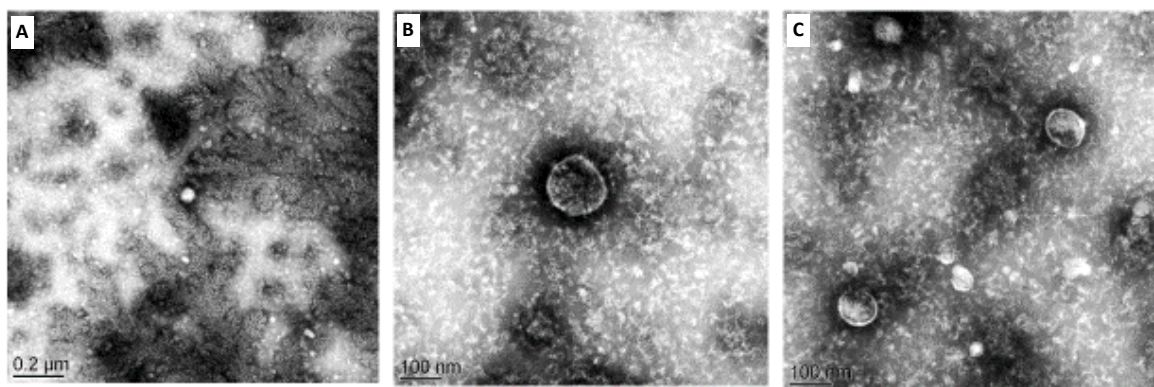


Figure 31: Observations par microscopie électronique des VEs de *Mmm* en fonction du stade de croissance. A: prélèvement en phase exponentielle (+48 h à partir d'une culture à 10^3 UFC/ml) ; B: prélèvement en phase stationnaire (+96 h à partir d'une culture à 10^3 UFC/ml) ; C: prélèvement en phase de déclin (+145 h à partir d'une culture à 10^3 UFC/ml).

Grace aux observations par microscopie électronique à transmission (MET) (Figure 31), il apparaît que l'abondance relative en vésicules observées, après un isolement dans les mêmes conditions, augmente donc au cours du temps en milieu m-PPLO. Les vésicules ne sont pas observées en phase exponentielle de croissance, elles apparaissent en phase stationnaire et continuent à augmenter en phase tardive. Il est important d'interpréter ces résultats avec prudence puisque le dénombrement par MET est une approche plus qualitative que quantitative. La MET permet de nous informer sur l'abondance de vésicules présentes sans pour autant quantifier leur concentration de manière fiable (Szatanek, Baj-Krzyworzeka et al. 2017, Hartjes, Mytnyk et al. 2019). En revanche, elle nous permet de visualiser la taille et la forme des VEs ainsi que la présence d'agrégats protéiques.

Sur les différents champs observés issus d'un des prélèvements en phase de déclin, la taille des VEs, estimée à partir de 127 vésicules, varie entre 50 et 140 nm. Ces VEs sont plus petites que celles observées lors de l'étude préliminaire qui avaient une taille comprise entre 70 et 200 nm et qui avaient été obtenues par filtration sur 0,2 μm . Il semble que la filtration sur 0,1 μm participe à l'élimination des grandes VEs (Figure 32).

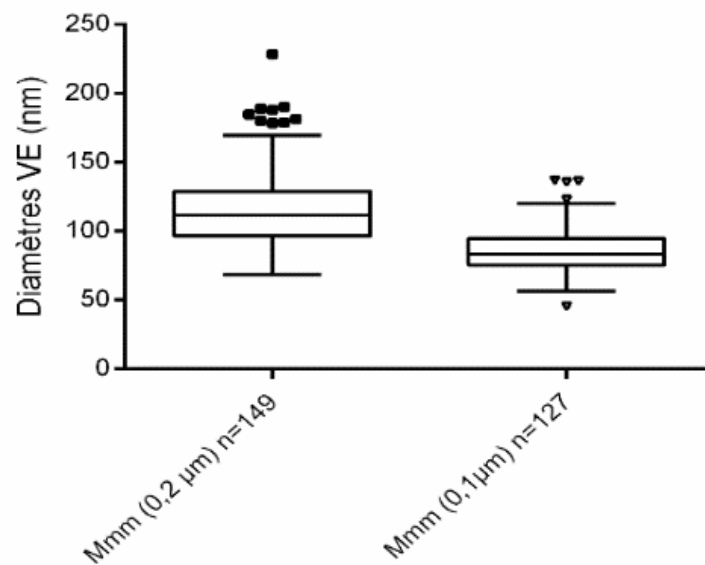


Figure 32: **Effet de la filtration sur la taille des VEs.** La filtration sur 0,2 μm a été réalisée lors de l'étude préliminaire à partir d'un échantillon en phase de déclin. La filtration sur 0,1 μm a été réalisée au cours de la comparaison de la production de VEs en fonction du stade de croissance à partir d'un échantillon en phase de déclin. n = nombre de VEs mesurées

La différence entre une taille de vésicule et une taille d'une cellule mycoplasmique est mince. Afin de nous assurer qu'il n'y avait pas de cellules viables dans nos culots de VEs nous avons donc réalisé des titrages qui ont confirmé l'absence de mycoplasmes viables.

4.3. Méthode de détection et de quantification relative des VEs :

Une approche complémentaire à la MET a été développée afin de faciliter la quantification des VEs. En effet, la microscopie électronique est une approche chronophage et compliquée à mettre en place en routine puisque nous utilisons un appareil présent sur une plateforme localisée dans un site différent. De plus, la microscopie électronique n'est pas adaptée à une quantification précise et est dépendante des champs observés. Même si l'étape de microscopie électronique reste indispensable à l'étude des VEs, l'utilisation d'une autre technique applicable en routine au laboratoire offre une opportunité de criblage intermédiaire à la MET permettant d'estimer la quantité de vésicules produites. Pour les bactéries Gram+/Gram-, les vésicules sont quantifiées indirectement en dosant la concentration en protéines (Hartjes, Mytnyk et al. 2019). Pour notre étude, les dosages des protéines totales réalisés sur les isolats préparés à partir des cultures aux différentes phases de croissance ont donné des résultats similaires pour les 3 phases ce qui va à l'encontre des observations par MET. Ces résultats démontrent que dans nos conditions expérimentales, le dosage protéique total ne reflète pas la densité des VEs observées et qu'il ne peut pas être utilisé. Cela est appuyé par les images de microscopie électronique montrant qu'en plus des vésicules mycoplasmaïques de nombreux agrégats protéiques sont présents. Bien que leur origine n'ait pas été recherchée, leur présence sur les clichés de la phase exponentielle suggère qu'ils proviennent du milieu de culture qui reste riche en protéines sériques et peptides issus de l'extrait de levure et ce, même avec seulement 10% de supplément. Ainsi, ces protéines faussant nos dosages protéiques, une autre méthode de quantification a dû être envisagée.

Une approche a été développée en s'appuyant sur les données issues du protéome membranaire vésiculaire, indiquant que la perméase du glucose (MSC_0860) est présente dans la membrane des vésicules de *Mmm* Afadé TR (Cf. Partie III ; chapitre 1 ; section 4.1). Or, nous disposons d'un anticorps monoclonal spécifique contre cette perméase, nommé 3F3. Nous avons donc évalué la faisabilité d'utiliser cet anticorps en routine pour estimer la concentration relative des vésicules présentes dans les isolats. Les culots de VEs préparés à partir des cultures aux différents temps de croissance (phase exponentielle, stationnaire, déclin) et dont l'abondance relative en vésicules a préalablement été estimée par microscopie électronique, ont donc été marqués par l'anticorps 3F3.

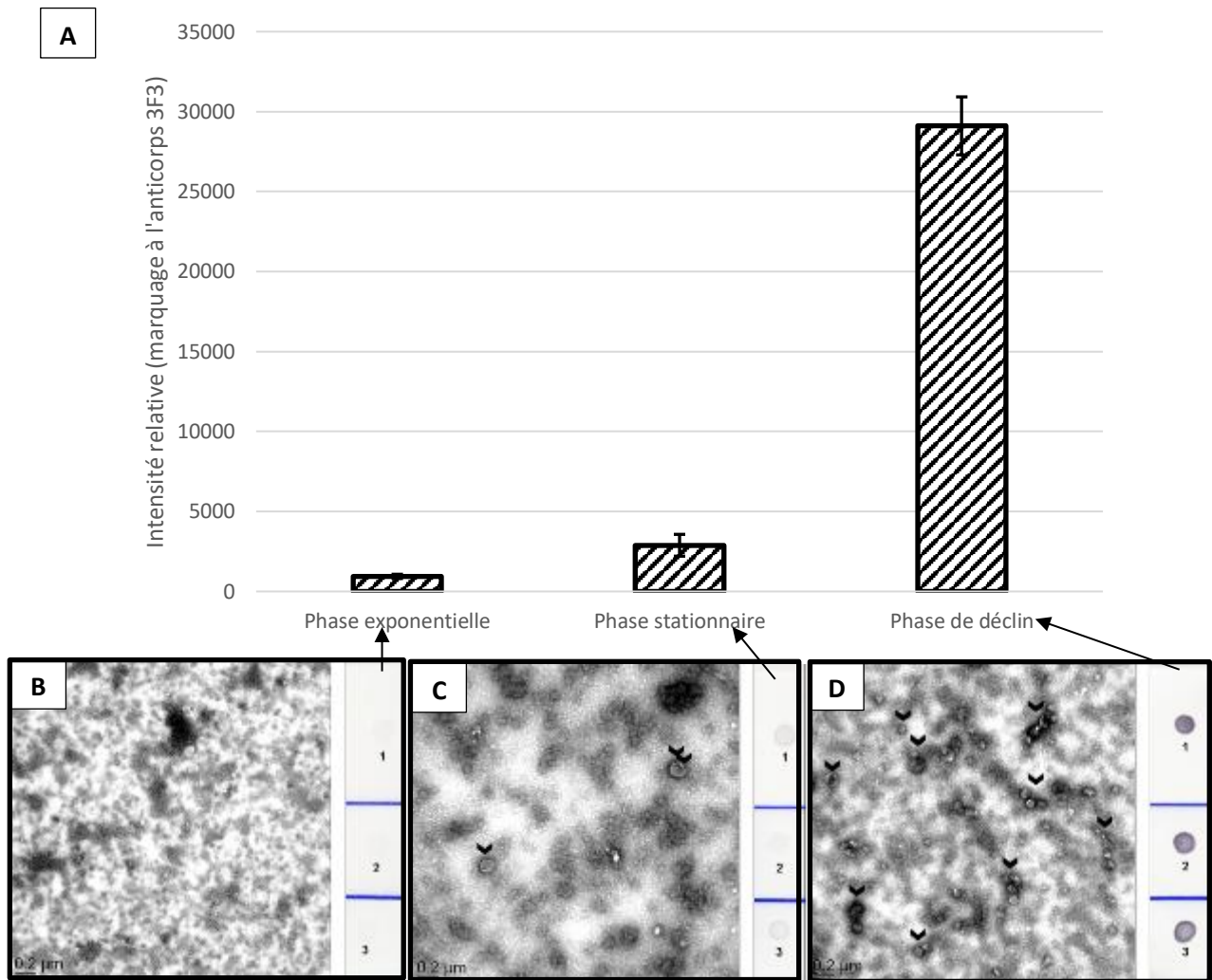


Figure 33 : Production de VEs de Mmm en fonction des trois phases de croissance. A : Comparaison de l'intensité de marquage par l'anticorps 3F3 de VEs obtenues à partir d'une phase exponentielle, stationnaire ou tardive de croissance d'une culture de Mmm Afadé variant TR en milieu m-PPLO. Mesures réalisées sur 3 réplicats indépendants. B,C,D : A droite : L'intensité de marquage est estimée à partir du dépôt de VEs sur membrane en triplicat et marquage au 3F3. 1 / 2 / 3 : numéro du réplica. Les flèches indiquent les histogrammes correspondants aux marquages. A gauche sont présentées les observations par microscopie électronique dont des exemples de VEs sont indiqués par les demi-flèches noires. B : Culot de VEs de Mmm Afadé TR en phase exponentielle de croissance. C : Culot de VEs de Mmm Afadé TR en phase stationnaire de croissance. D : Culot de VEs de Mmm Afadé TR en phase de déclin.

L'intensité du marquage est identique entre les 3 répliques pour chaque phase de croissance et est en adéquation avec les observations par microscopie électronique (Figure 33). En effet, une augmentation de la production de vésicules est observée en fonction des stades de croissance, l'intensité du marquage augmente légèrement en phase stationnaire mais est bien plus importante en phase de déclin. Ce marquage sera donc utilisé pour la suite des recherches même s'il n'est sans doute pas exhaustif puisqu'il ne permet de cibler qu'une population de vésicules dotée de la perméase PtsG mais tout comme la microscopie électronique, cette approche est informative et permet d'estimer la concentration relative de vésicules.

Avec deux approches complémentaires, la microscopie électronique et le marquage par le 3F3, nous parvenons à la même conclusion : la quantité de vésicules produites est plus importante en phase tardive de croissance, là où la viabilité est diminuée ($7,5 \pm 0,1$ log) (Figure 30). Se pose alors la question de savoir si ces vésicules sont produites par des bactéries viables ou si elles résultent d'un phénomène de lyse bactérienne et recircularisation des membranes.

4.4. La production de vésicules, mécanisme actif ?

Afin de savoir si les vésicules de *Mmm* sont produites par des cellules viables, *Mmm* Afadé variant TR a été soumis à différents stress visant à réduire partiellement ou à éliminer les cellules viables: choc thermique à 60°C pendant 1 heure, stress antibiotique grâce à l'utilisation de la gentamicine et stress acide par diminution du pH. Les cultures stressées ou non sont incubées 3 jours (jusqu'en phase de déclin théorique) avant l'isolement des vésicules. La concentration relative des vésicules a été estimée par le marquage 3F3.

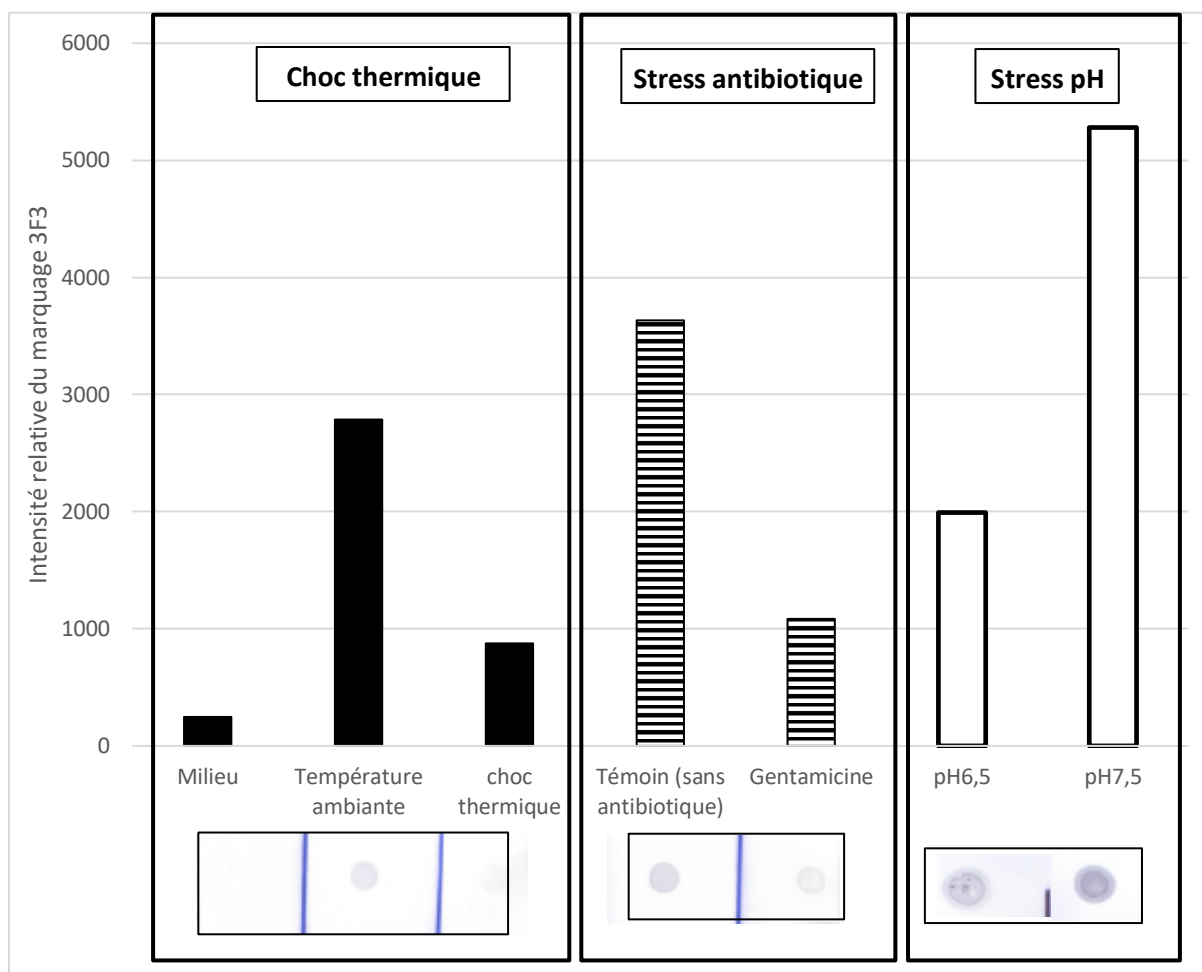


Figure 34: **Stress et production de VEs.** Intensité relative du marquage des VEs réalisé une fois grâce à l'anticorps 3F3. Les VEs sont prélevées après 3 jours d'incubation à la suite de l'exposition ou non des cultures à un stress (choc thermique, stress antibiotique ou stress pH). L'intensité de marquage a été mesurée à partir des dépôts de vésicules sur membrane et marquage au 3F3.

4.4.1. Choc thermique :

La viabilité de *Mmm* peut être fortement réduite, voire éliminée, par une incubation à 60°C pendant 1 h (Dedieu, Chapey et al. 2005, Zella, Curreli et al. 2018). Dans nos conditions, la culture soumise au choc thermique voit son titre initial de $3,4 \times 10^9$ ufc/ml chuter puisqu'aucune colonie n'est dénombrable (titre de moins de 200 ufc/ml) au moment de l'isolement des VEs. Cette perte de viabilité n'est pourtant pas associée à une augmentation de la production de vésicules puisque le marquage des VEs au 3F3 est plus important pour la culture témoin incubée à température ambiante que celle soumise au choc thermique (Figure 34). Les résultats du marquage 3F3 ont été confirmés par MET où des vésicules sont observées pour la culture témoin tandis que celle placée à 60°C ne présente que des agrégats dans les champs observés (Figure 35).

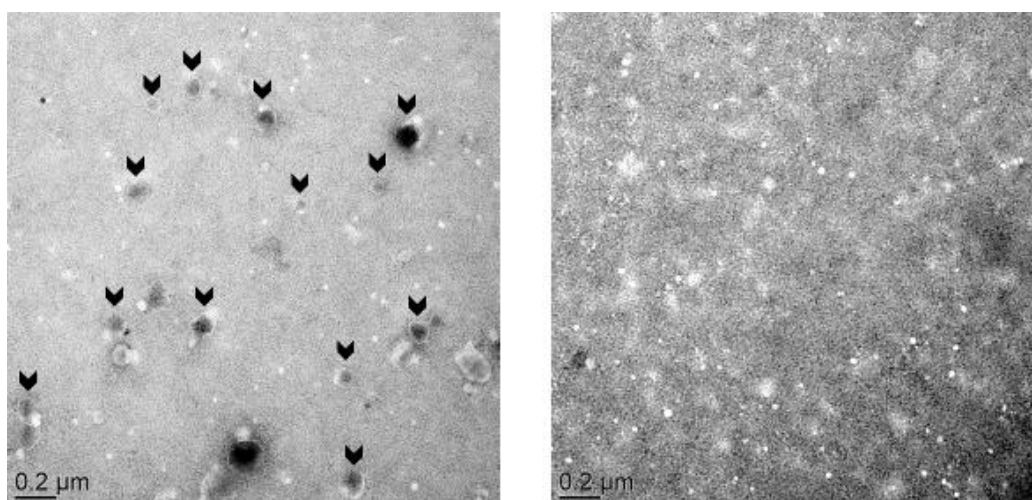


Figure 35 : **Choc thermique et production de VEs.** A gauche est présentée les observations par MET de VEs issues de la culture restée à température ambiante et qui présente de nombreuses vésicules indiquées par les flèches noires. A droite est présentée les observations obtenues à partir de la culture placée à 60°C pendant 1 heure et qui ne présentent pas de vésicules.

4.4.2. Stress antibiotique :

Un stress antibiotique a également été réalisé en incubant une des cultures avec de la gentamicine à une concentration (200 µg/ml) nettement supérieure à la concentration minimale inhibant 90% de *Mmm* (64 µg/ml)(Ayling, Bisgaard-Frantzen et al. 2005). La culture incubée avec l'antibiotique a présenté une chute du titre passant de $3,2 \times 10^8$ ufc/ml avant l'ajout de l'antibiotique à un titre inférieur à 200 ufc/ml lors de l'isolement des VEs puisqu'aucune colonie n'a été dénombrée. En revanche, la culture non traitée avec un titre initial à $3,2 \times 10^8$ ufc/ml a vu son titre légèrement diminué à $1,3 \times 10^7$ ufc/ml lors de l'isolement des VEs. Le marquage des VEs avec l'anticorps 3F3 a donné un signal plus intense pour la culture non traitée par rapport à la culture incubée avec la gentamicine (Figure 34). La chute du titre n'est donc pas associée à une augmentation de la production de VEs.

4.4.3. Stress pH :

Mmm est un mycoplasme sensible à l'acidification de son environnement. En milieu de culture, la diminution de sa viabilité est classiquement reliée à l'acidification du milieu de culture (Gaurivaud, Lakhdar et al. 2014). Ainsi, un stress acide peut être utilisé afin de réduire la viabilité de *Mmm in vitro*. Il a été réalisé grâce à deux cultures dans du milieu APSM, dont le pH a été initialement ajusté à 6,5 ou 7,5 (l'ajout de Tris au milieu favorise un certain maintien du pH).

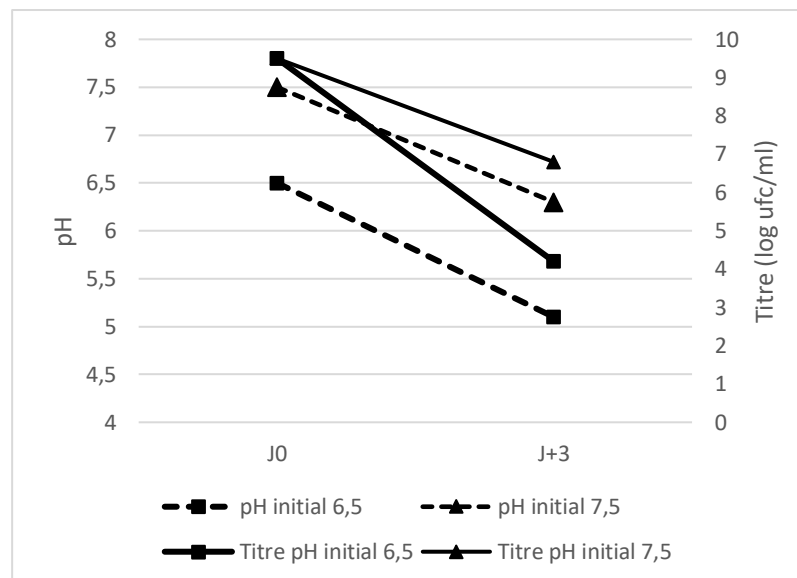


Figure 36 : **Evolution du titre et du pH d'une culture de *Mmm* lors du stress pH.** J0 correspond au titre (trait plein) et au pH (tirets) initial. J+3 : correspond au titre et au pH au moment du prélèvement après 3 jours d'incubation. La diminution du titre est plus importante en condition pH initial 6,5 (carré) que 7,5 (triangle).

Après 3 jours d'incubation, le pH des cultures a été mesuré, il a diminué jusqu'à 5,1 pour la culture initialement à pH 6,5 (Figure 36). Cette baisse du pH a été accompagnée d'une chute du titre, celui-ci est passé de $3,2 \times 10^9$ ufc/ml à $1,6 \times 10^4$ ufc/ml. Le marquage des VEs avec l'anticorps 3F3 (Figure 34) a été plus important pour la culture dont le pH au moment de l'isolement est de 6,3 et dont le titre a le moins chuté.

Ainsi, les mêmes résultats ont été obtenus à partir de 3 stress différents, suggérant que la mort cellulaire liée au stress appliqué n'est pas associée à une augmentation de la production des vésicules. Ceci confirme indirectement que la production de vésicules nécessite des bactéries viables et n'est pas associée à un processus dégénératif de type lyse cellulaire puis réassociation de fragments membranaires. Les vésicules produites par *Mmm* Afadé TR remplissent entièrement les critères de définition de VEs : elles ont une taille comprise entre 20 et 400 nm (a fortiori pour *Mmm* Afadé : 50 à 140 nm), elles ont une forme sphérique et sont produites par des bactéries viables.

4.5. Observation de la formation de vésicules :

Comme la production de VEs de *Mmm* Afadé se fait à partir de cellules vivantes, nous avons analysé une culture en phase stationnaire de croissance par microscopie électronique afin de voir s'il était possible d'observer la formation des vésicules à la surface du mycoplasme. Les observations par microscopie électronique (Figure 37) montrent que des formes sphériques d'une taille vésiculaire (ici 120 nm) semblent se détacher, comme des bourgeonnements, de la surface d'une cellule d'une taille mycoplasmaïque (ici 870 nm). Ces observations confirment les résultats précédents suggérant que la formation de vésicules nécessite des bactéries viables.

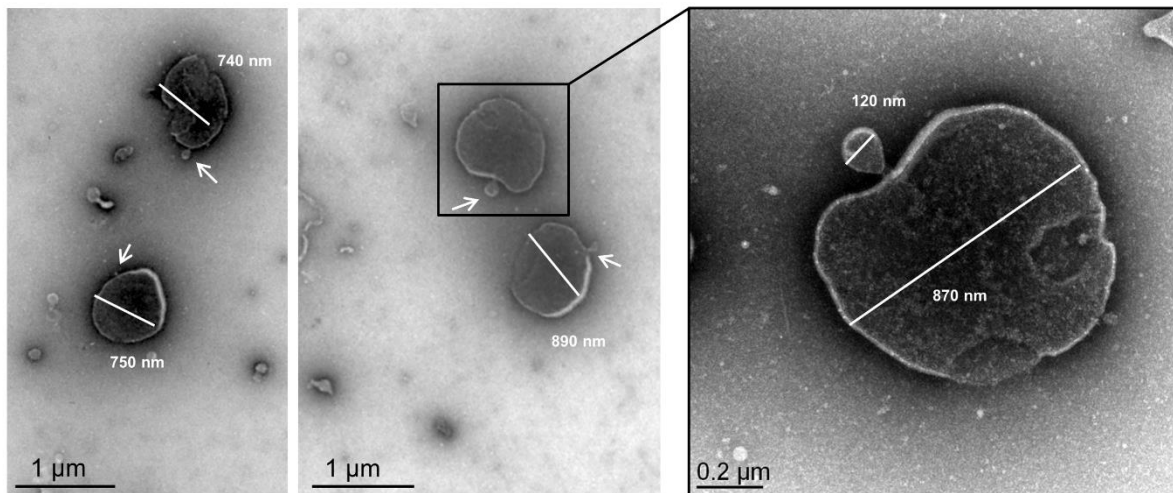


Figure 37: **Observation par microscopie électronique de cultures en phase stationnaire de croissance de *Mmm* Afadé variant TR.** L'encadré noir correspond à un zoom d'une partie de l'image centrale. Les flèches correspondent à de potentielles vésicules en formation.

5. Discussion :

Les travaux préliminaires menés en amont de cette thèse ont permis de démontrer la production de VEs chez plusieurs espèces du genre *Mycoplasma* isolées d'hôtes différents (caprins, bovins, humains). Chez les *Mollicutes*, ce processus n'est donc pas limité à *A. laidlawii*, l'espèce modèle d'études antérieures sur les VEs (Chernov, Chernova et al. 2011, Chernov, Mouzykantov et al. 2014), comme cela avait été suggéré par Chernov et collaborateurs en 2011 qui avaient détecté la présence de formes vésiculaires par microscopie à force atomique chez *M. gallisepticum* sans pour autant les caractériser. Les VEs observées en microscopie électronique pour 6 espèces appartenant au genre *Mycoplasma* dont 5 pathogènes chez les ruminants, nos modèles d'étude, présentent des diamètres différents. Par exemple *M. bovis* produit des VEs de petite taille (entre 40 et 100 nm) et homogènes tandis que *Mmm* produit des VEs de plus grande taille et plus variable (entre 70 et 200 nm). De même, la quantité relative de VEs observées varie d'une espèce à l'autre. Par exemple, le culot de *Mmm* était riche en VEs contrairement à celui de *Mmc* où seulement 3 VEs ont pu être observées sur les différents champs de microscopie. Pour *Mmc* et *Mcc*, les VEs ont dû être purifiées après 2 jours d'incubation au lieu des quatre utilisés pour les autres espèces afin de tenir compte d'un temps de génération plus court et d'une plus grande capacité à acidifier le milieu, ces deux caractéristiques entraînant une perte de titre. Ceci illustre bien les difficultés rencontrées pour mettre au point une méthode standardisée de production des VEs *in vitro*, qui serait applicable à toutes les espèces mycoplasmaïques. Le milieu m-PPLO n'est peut-être pas adapté à la production de VEs pour toutes les (sous) espèces étudiées et l'utilisation d'un autre milieu plus stressant et contenant encore moins d'éléments nutritifs ou l'application d'un stress différent (oxydatif, carence ferrique, choc thermique...) serait peut-être nécessaire dans certains cas. Ces travaux préliminaires ont tout de même permis d'observer, qu'avec nos conditions de production, la sous espèce *Mmm* produisait de nombreuses vésicules et que les isolats vésiculaires n'étaient pas contaminés par des mycoplasmes viables. La contamination par des mycoplasmes est une difficulté supplémentaire à l'étude des VEs, l'espèce *Mmm* a donc été choisie comme modèle d'étude pour la suite des travaux.

Sur ce modèle, nous nous sommes attachés à évaluer si les vésicules observées étaient activement sécrétées comme le veut la définition canonique des vésicules extracellulaires (Deatherage et Cookson 2012, Roier, Zingl et al. 2016, Coelho et Casadevall 2019). En général, chez les bactéries Gram- et Gram+, la sécrétion des VEs est observée en phase exponentielle ou au début de la phase stationnaire de croissance (Tartaglia, Breyne et al. 2018, Wagner, Joshi et al. 2018), ce qui ne laisse que peu de doute sur le caractère actif de leur sécrétion. Pour autant, certains modèles bactériens semblent échapper à cette règle. Par exemple, chez la bactérie Gram-, *Francisella novicida*, la production de vésicules a été initialement démontrée en phase stationnaire tardive (Pierson, Matrakas et al. 2011) puis, plus récemment, en moindre quantité, en phase exponentielle et en début de phase stationnaire de croissance (McCaig, Koller et al. 2013). En comparant la production de vésicules en fonction des différents stades de croissance pour *Mmm*, nous avons montré que la densité relative des VEs était plus importante en phase de déclin qu'en phase stationnaire et exponentielle. Dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pas observé de VEs en phase exponentielle. Il peut être envisagé que ces vésicules soient produites en plus faible quantité, comme cela a été démontré pour *F. novicida*, ou que notre rendement de purification des vésicules ne soit pas optimal pour permettre leur détection. La comparaison de la croissance de *Mmm* en milieu PPLO et m-PPLO nous permet de formuler une hypothèse quant au lien entre vésicules et phase de croissance. La formation des VEs chez les bactéries est avant tout une réponse au stress, ainsi, *in vitro*, des stress nutritionnels, ferriques ou oxydatifs sont classiquement utilisés pour stimuler la production des VEs (Klimentova et Stulik 2015). Dans le cas de *Mmm* la croissance en m-PPLO est en tout point identique à celle en PPLO pour la phase exponentielle et stationnaire. Cela suggère qu'à ces stades de croissance, la déplétion en supplément du m-PPLO ne correspond pas à un stress ou que celui-ci est minime et devient sensible uniquement en phase de déclin.

L'observation de la plus grande quantité de VEs en phase de déclin nous amène à nous interroger sur le type de cellules les produisant (cellules lysées ou viables). En effet, à ce stade, avec une forte mortalité cellulaire, les VEs pourraient correspondre à une réassociation aléatoire de fragments membranaires issus de cellules lysées (Coelho et Casadevall 2019). Nous avons démontré que lorsque les cellules mycoplasmaïques sont tuées par un stress exogène (température, acidité ou antibiotique), cela n'entraîne pas d'augmentation de la quantité de vésicules observées. Par ailleurs, les bourgeonnements observés par microscopie électronique à la surface de mycoplasmes en phase stationnaire de croissance corroborent ce résultat d'un processus actif de sécrétion des vésicules mais le mécanisme de formation des VEs reste pour le moment totalement méconnu.

Chez d'autres bactéries, plusieurs mécanismes de formation ont été proposés et consistent chez les Gram- en une altération de l'interaction entre le peptidoglycane et la membrane externe ou une modification des charges de surface (Brown, Wolf et al. 2015). Chez les Gram+, il a été proposé qu'une pression de turgescence ou une dégradation enzymatique à certains points du peptidoglycane entraîneraient la formation de VEs (Schwechheimer et Kuehn 2015). Chez un mycoplasme des suidés, une étude a récemment mis en évidence la formation de structures sphériques *in vitro* au sein d'un biofilm à partir d'un variant de *M. hyopneumoniae* dont la taille cellulaire est plus grande que celle rencontrée habituellement. Ce variant possède une membrane perméable et produit des sphères par bourgeonnement à sa surface ou suite à l'explosion de la cellule (Raymond, Jenkins et al. 2018). Dans le deuxième cas, il pourrait s'agir de VEs se formant au sein des biofilms suite à une explosion cellulaire et re-assemblage de fragments membranaires. Ce mécanisme de cellules explosives générant des vésicules a notamment été décrit chez *Pseudomonas aeruginosa* (Turnbull, Toyofuku et al. 2016) et résulte d'un programme génétique aboutissant à la synthèse et la libération d'une endolysine dégradant le peptidoglycane en condition de stress. Dans le cas de *Mmm*, les observations par microscopie électronique et l'absence d'une augmentation du nombre de vésicules en cas de mortalité cellulaire suggèrent une production de vésicules par bourgeonnement de surface bien que l'hypothèse des cellules explosives ne puisse être totalement écartée pour le moment. Si cet événement existe, il est sans doute rare car observé occasionnellement par Raymond et ses collaborateurs chez *M. hyopneumoniae* et pourrait contribuer modérément à la formation de certaines vésicules. Dans l'état actuel de nos connaissances, nous ne pouvons pas estimer la proportion de VEs qui pourraient résulter de cellules explosives. Nous avons pu observer que dans nos isolats de VEs, environ 3% des VEs avaient une taille assez importante (supérieure à 170 nm) et qu'il était possible de les éliminer par une filtration sur 0,1µm. Pour le moment, nous ne pouvons pas statuer sur l'origine de ces grandes VEs, à savoir, si elles sont le fruit d'une division aberrante, avec un septum de division excentré ou si elles sont simplement de grandes vésicules produites par bourgeonnement. En revanche, nous pouvons écarter l'hypothèse de la formation de « corps élémentaires » au sens de Robertson en 1975 (Robertson, Gomersall et al. 1975) puisqu'un corps élémentaire ne passe pas au travers de filtres de 0,22 µm de porosité.

Quoi qu'il en soit, même si la voie de production des VEs des mycoplasmes n'est pour le moment pas connue, ces vésicules sont libérées dans le milieu extracellulaire et contiennent de potentiels facteurs de virulence, contribuant ainsi à multiplier les interactions avec l'hôte. Pour le moment, nos recherches ont uniquement porté sur les protéines membranaires des VEs. Leur nature varie d'une espèce de mycoplasme à l'autre mais certaines sont communes aux trois espèces étudiées. Ainsi la lipoprotéine P37, le facteur d'élongation EF-Tu et la protéine chaperonne DnaK sont identifiés dans les protéomes membranaires vésiculaires de *Mmm* Afadé TR, *M. agalactiae* 5632 et *M. fermentans* PG18. La lipoprotéine P37 et la protéine DnaK ont toutes les deux des propriétés oncogéniques (Gong, Meng et al. 2008, Zella, Curreli et al. 2018). Il a notamment été montré *in vitro* que la protéine DnaK produite par *M. fermentans* avait la capacité de se lier à un régulateur de la protéine P53 ce qui réduit sa stabilité et ses propriétés anticancéreuses (Zella, Curreli et al. 2018). La protéine DnaK de *M. fermentans* est phylogénétiquement proche de celle d'*Helicobacter pylori*, *Fusobacterium nucleatum* et *Chlamydia trachomatis* (Zella, Curreli et al. 2018), des bactéries fréquemment associées à des cancers humains. Les VEs mycoplasmiques pourraient participer à la dissémination de DnaK sur de grandes distances loin du site d'infection et pourraient être également une voie de « transmission » de ce facteur oncogénique à la cellule eucaryote. En effet, les vésicules bactériennes sont connues pour délivrer des protéines mais aussi d'autres molécules aux cellules eucaryotes (Kuehn et Kesty 2005, Bitto, Chapman et al. 2017). Une autre protéine, Ef-Tu, est présente dans les 3 protéomes membranaires vésiculaires. C'est une protéine capable d'immobiliser le plasminogène et de l'activer en plasmine en présence de ses activateurs (Widjaja, Harvey et al. 2017, Yu, Wang et al. 2018). La plasmine activée participe à l'inflammation et au détournement du système du complément (Barthel, Schindler et al. 2012). Les VEs pourraient alors intervenir dans l'inflammation et l'échappement au système immunitaire. Comme Ef-Tu, d'autres protéines moonlighting ont été identifiées dans le protéome membranaire vésiculaire de *Mmm* et pourrait immobiliser le plasminogène comme la leucine aminopeptidase (MSC_0163) ou l'énolase. Il a été montré chez *M. bovis* qu'une α -énolase a la capacité de se lier au plasminogène (Song, Li et al. 2012) et chez *M. hyopneumoniae* qu'une leucine aminopeptidase participe à l'immobilisation du plasminogène et à son activation en plasmine (Jarocki, Santos et al. 2015). Une autre protéine moonlighting, NOX, a été identifiée dans le protéome membranaire vésiculaire de *Mmm* et participe chez *M. bovis* à l'adhésion aux cellules EBL (Zhao, Zhang et al. 2017). Ces protéines dotées d'activité d'adhésion pourraient notamment favoriser l'interaction entre la vésicule et les cellules de l'hôte afin d'entrer dans la cellule et de libérer le contenu présent à l'intérieur de la VEs. La lipoprotéine lppA de *Mmm* a également été identifiée, c'est un antigène fortement reconnu par le système immunitaire et notamment les lymphocytes T-helper (Totte, Mather et al. 2010).

Ces lipoprotéines pourraient participer à la modulation de la réponse immunitaire et notamment détourner la réponse loin du site d'infection. Une lipoprotéine homologue à la sérine protéase MIP a été identifiée dans le protéome membranaire vésiculaire de *Mmm* et pourrait participer au clivage d'IgG (Arfi, Minder et al. 2016), cependant la protéine MIB, indispensable au système MIB-MIP, n'a pas été identifiée dans notre protéome vésiculaire. De nouveaux essais utilisant une plus grande quantité de matériel vésiculaire pourraient permettre de trouver cette protéine.

Les VEs des mycoplasmes permettent donc la dissémination de nombreuses protéines dont le rôle dans la virulence a été démontré chez certaines espèces mycoplasmiques. La caractérisation complète du cargo nous permettra à l'avenir d'identifier les potentiels autres facteurs de virulence qui pourraient être protégés à l'intérieur des VEs mycoplasmiques notamment des protéases et DNAses de l'hôte. Mais pour aller plus loin dans la caractérisation du cargo, il est nécessaire de mettre au point une approche de purification efficace. Cette étape est difficile chez les mycoplasmes. En effet, ces bactéries sont cultivées dans des milieux complexes supplémentés en sérum et extrait de levure apportant de nombreuses protéines contaminantes, même dans le milieu m-PPLO pour lequel la quantité de supplément a été réduite. De plus, les VEs sont principalement produites lors de la phase de déclin, au moment où le nombre de cellules lysées augmente, libérant leur contenu cytoplasmique dans le milieu de culture. Toutes ces difficultés justifient la nécessité d'améliorer encore la purification des vésicules, notamment si l'on souhaite s'intéresser à la caractérisation du cargo qui comprend aussi des protéines cytoplasmiques. En parallèle, la recherche d'une approche de culture s'affranchissant de la production de VEs en phase de déclin, c'est-à-dire une production en phase exponentielle ou stationnaire de croissance, permettra également de limiter l'apport en protéines contaminantes.

L'obtention de matériel purifié pourrait permettre de s'intéresser plus spécifiquement au(x) rôle(s) de ces VEs à savoir, si elles induisent des lésions ou modulent la réponse immunitaire de l'hôte ou si elles sont capables d'interagir avec des cellules de l'hôte pour transmettre leur contenu comme cela a déjà pu être démontré chez d'autres bactéries (Bomberger, Maceachran et al. 2009). De plus, la caractérisation des VEs formées par les mycoplasmes en co-culture avec des cellules de l'hôte ou *in vivo* permettrait de mieux comprendre leur rôle potentiel dans l'interaction avec l'hôte.

Chapitre 2 : Amélioration des conditions de production et purification des vésicules.

1. Contexte et stratégie de recherche :

Des vésicules extracellulaires ont été observées chez diverses espèces appartenant au genre *Mycoplasma* ainsi que chez un autre *Mollicute*, *A. laidlawii* (Chernov, Chernova et al. 2011, Gaurivaud, Ganter et al. 2018). Ces vésicules portent à leur surface des protéines pouvant participer à l'interaction avec l'hôte (Partie III chapitre 1). Pour des raisons techniques, seules les protéines membranaires ont été étudiées mais les VEs pourraient transporter d'autres protéines, voire d'autres molécules.

Pour aller plus loin dans la caractérisation du contenu vésiculaire, il est nécessaire d'améliorer la méthode de purification. En effet, des agrégats protéiques ont été observés par microscopie électronique dans nos précédents culots de VEs (Partie III ; chapitre 1 ; paragraphe 4.2). La complexité de l'approche de purification, par rapport à celle utilisée pour les bactéries Gram+ et Gram- tient du fait que les VEs de notre modèle d'étude, *Mmm*, sont produites d'une part, dans des milieux complexes apportant de nombreuses protéines contaminantes et d'autre part, du fait que la plus grande quantité de VEs sont produites en phase de déclin qui est une phase non idéale puisque des cellules mortes, non productrices de vésicules, y sont présentes. Il est raisonnable de supposer qu'en phase de déclin des protéines mycoplasmiennes contaminantes issues de cellules lysées sont présentes et qu'il est nécessaire de les séparer des VEs. Cette purification est d'autant plus importante que des protéines cytoplasmiques sont attendues dans le cargo et qu'elles ne doivent pas être confondues avec celles qui résulteraient d'évènements de lyse.

Notre objectif consiste donc à évaluer différentes stratégies pour optimiser la production et la purification des VEs. Dans un premier temps, nous avons cherché à obtenir des VEs en amont de la phase de déclin pour réduire l'impact de la potentielle lyse cellulaire. Dans un second temps, nous avons tenté de limiter l'apport en protéines exogènes en utilisant un milieu défini ne contenant pas de sérum et d'extrait de levure. Enfin, les possibilités d'améliorer la purification par l'utilisation de gradients de densité ont été évaluées.

2. Introduction :

Les vésicules extracellulaires (VEs) sont des sphères protéolipidiques non répliquatives dérivant des membranes et produites par toutes les cellules vivantes. Chez les procaryotes, elles sont sécrétées aussi bien par les bactéries Gram- que Gram+ et leur taille varie entre 20 et 400 nm (Toyofuku, Nomura et al. 2019). Les VEs sont produites activement par les bactéries en réponse à différents stress que ce soit un stress nutritionnel, une modification de la température, l'exposition à des agents chimiques néfastes qui vont induire l'accumulation de protéines dénaturées mais également suite à des modifications de la membrane ou de la paroi (McBroom et Kuehn 2007, Klimentova et Stulik 2015, Orench-Rivera et Kuehn 2016).

Le mécanisme de formation de ces structures en lui-même, chez les bactéries, n'est pas totalement connu mais il peut se décomposer en deux étapes : (1) la membrane doit se détacher de ses liens avec le peptidoglycane et (2) elle doit se replier pour former un bourgeonnement et donc une vésicule (Schwechheimer et Kuehn 2015). Chez les Gram- ces mécanismes reposent principalement sur une altération de l'interaction entre le peptidoglycane et la membrane externe ou une altération des charges à la surface entraînant la formation d'un bourgeonnement (Schwechheimer et Kuehn 2015). Chez les Gram +, la production de vésicules a été découverte plus récemment et les mécanismes de formation suggérés consistent en l'induction d'une pression de turgescence ou la diminution de l'épaisseur du peptidoglycane par des activités enzymatiques (Brown, Wolf et al. 2015).

Une étude récente a permis d'aborder la biogénèse de VEs chez les bactéries Gram-. Chez *Haemophilus influenzae*, un mécanisme de formation utilisant des gènes qui participent au maintien de l'asymétrie lipidique de la membrane externe en évitant l'accumulation de phospholipides a été proposé. Avec ce modèle, la perte des gènes *yrbB* et *yrbE* entraîne une augmentation de la formation de VEs (Roier, Zingl et al. 2016). Ce même type de modèle est proposé chez *Salmonella enterica* où la formation de VEs est régulée par plusieurs gènes impliqués dans la stabilité de la paroi, l'accumulation de protéines mal repliées ou la composition du LPS (Nevermann, Silva et al. 2019).

Des bactéries dépourvues de paroi produisent également des VEs comme cela a été montré chez les *Mollicutes*. Des vésicules ont été décrites chez *A. laidlawii* ainsi que chez des espèces appartenant au genre *Mycoplasma* (Chernov, Chernova et al. 2011, Gaurivaud, Ganter et al. 2018). Comme chez les autres bactéries, les VEs des mollicutes sont composées de nombreuses protéines qui pourraient interagir avec l'hôte (Chernov, Mouzykantov et al. 2014, Gaurivaud, Ganter et al. 2018). La caractérisation du protéome vésiculaire d'espèces pathogènes du genre *Mycoplasma* n'a pour le moment porté que sur les protéines membranaires. En effet, la caractérisation du protéome vésiculaire dans sa globalité est dépendante de l'obtention de matériel purifié, dépourvu de protéines contaminantes issues du milieu de culture ou d'éventuelles cellules lysées.

Une des principales difficultés associées à la purification et à l'étude des VEs des mycoplasmes est la nécessité de cultiver ces bactéries exigeantes dans des milieux supplémentés en sérum et extrait de levure et donc riches en protéines (Razin 1978). Comme les exosomes eucaryotes prélevés à partir de sérum ou de plasma, les vésicules des mycoplasmes doivent être correctement purifiées (Abramowicz, Widlak et al. 2016, Takov, Yellon et al. 2019). Nous avons montré dans le chapitre précédent que la production de vésicules s'effectuait principalement en phase de déclin où des protéines mycoplasmiques contaminantes, issues de cellules lysées, pourraient être présentes et nécessiteraient donc, d'être éliminées. Différentes approches de purification ont été proposées dans la littérature (Tableau 9) telles que l'utilisation de gradients de densité ou la chromatographie d'exclusion de taille (Klimentova et Stulik 2015). Différents types de gradients (sucrose, dextran) peuvent être utilisés mais celui à base d'iodixanol semble le plus adapté à l'étude des VEs de par ses propriétés iso-osmotiques (Graham 2002, Prados-Rosales, Brown et al. 2014, Abdi, Yu et al. 2017). Il a notamment été utilisé pour l'étude des VEs chez un *Mollicute*, *A. laidlawii* (Chernov, Mouzykantov et al. 2014).

Les approches de purification les plus décrites sont résumées dans le tableau ci-dessous. Dans certains cas, plusieurs méthodes de purification sont utilisées à la suite afin d'améliorer la pureté des isolats vésiculaires (Onodi, Pelyhe et al. 2018).

Tableau 9: **Principales méthodes utilisées pour la purification des VEs** produites par tous types de cellules (eucaryote, procaryote (Gram+ et Gram-)) (liste non exhaustive). Tableau adapté de (Konoshenko, Lekchnov et al. 2018).

Méthode de purification	Avantages	Inconvénients	Exemples
Ultracentrifugation	Approche facile à mettre en place si un appareil est disponible et le coût de cette technique est faible. Permet de concentrer les VEs à partir d'un grand volume.	De nombreux lavages sont nécessaires et cela peut endommager les VEs. Cette approche est inefficace pour éliminer les nombreuses protéines du milieu.	(Abdi, Yu et al. 2017, Dauros Singorenko, Chang et al. 2017, Tartaglia, Breyne et al. 2018)
Gradient de densité	Approche à un coût raisonnable. Le gradient OptiPrep est iso-osmotique.	Perte et sélection de certaines populations de VEs. Grande disparité des protocoles (« Top-loading », « Bottom-loading », nombre de couches), cette approche nécessite donc une mise au point et une méthode complémentaire de détection des VEs pour cibler la fraction les contenant.	(Abdi, Yu et al. 2017, Dauros Singorenko, Chang et al. 2017)
Ultrafiltration (0,8–0,1 μ m)	Approche simple et facile à mettre en œuvre sans limitation de volume.	Colmatage des filtres, contamination des préparations par des protéines, perte d'échantillon et déformation des VEs.	(Guerreiro, Vestad et al. 2018)
Chromatographie d'exclusion de taille	Approche reproductible et très sensible associée à peu de perte.	Nécessité de disposer d'équipements spécialisés et co-isolation d'agrégats protéiques. Méthode non adaptée pour des grands volumes.	(Onodi, Pelyhe et al. 2018)
Colonne d'affinité	Approche rapide et spécifique.	Sélection d'une certaine population et nécessité de connaître le contenu vésiculaire. Méthode non adaptée pour des grands volumes.	(Sharma, Ludwig et al. 2018)
Précipitation au polyéthylène glycol	Procédure peu onéreuse et simple à mettre en place.	Présence de contamination et rétention de polymères.	(Ludwig, De Miroschedji et al. 2018)
Kit d'isolement de type « exoquick »	Procédure simple et rapide.	Approche très onéreuse et peu reproductible où des impuretés peuvent persister. Méthode non adaptée pour des grands volumes.	(Lobb, Becker et al. 2015)

Toutes ces méthodes ne sont pas adaptées à la purification d'VEs issus de milieux complexes. Les VEs produites par des bactéries facilement cultivables sur milieu minimum n'ont pas besoin d'être purifiées par de multiples approches. Une filtration suivie d'une ultracentrifugation et, dans certains cas, d'un gradient de densité suffisent à obtenir des VEs pures. Chez les mycoplasmes, parmi toutes ces techniques, une seule étude a été décrite mettant en jeu la filtration (pour éliminer les bactéries), l'ultracentrifugation et l'utilisation de gradients (Chernov, Mouzykantov et al. 2014). Nos résultats précédents ont montré que l'approche de purification des mycoplasmes utilisant la filtration et des lavages par ultracentrifugation n'est pas assez efficace et qu'elle doit être optimisée.

Les objectifs de ce travail sont (1) d'évaluer si un milieu maintenant *Mmm* en phase stationnaire peut être utilisé pour la production de VEs en remplacement du milieu m-PPLO, pour lequel la production de vésicules est plus importante en phase de déclin. Puis (2) d'évaluer si un milieu défini ne contenant pas de sérum et d'extrait de levure peut être utilisé à la place du m-PPLO afin de limiter l'apport en protéines. Enfin, (3) d'améliorer notre qualité de purification par l'utilisation de gradients de densité afin d'accéder au contenu vésiculaire entier.

3. Matériel et Méthodes :

3.1. Souche et milieux de culture :

Un stock congelé à -20°C du variant translucide (TR) de *Mmm* Afadé en milieu PPLO a été utilisé pour la préparation des cultures. A partir de ce stock, une pré-culture a été réalisée en milieu PPLO, (Tableau 10), puis les mycoplasmes ont été transférés après centrifugation à 12 000xg à 20°C durant 30 min, en milieu m-PPLO ou APSM ou OptiMEM (Tableau 10). Le pH du milieu APSM a été maintenu grâce à une prise de pH régulière et ajustement à pH 6,8 ou 7,5 par ajout de NaOH (4M) sous environnement stérile, directement dans la culture.

Tableau 10: *Composition des milieux PPLO, m-PPLO, APSM et OptiMEM*

	PPLO	m-PPLO	APSM	OptiMEM
Milieu de base	70% : 1,4%(w/v) de bouillon pour mycoplasme ; 1% (w/v) de tryptose ; 0,3% (w/v) d'extrait de levure ; 0,1% (w/v) de glucose			Opti-MEM® GlutaMAX®
Supplément (48% (v/v) de sérum de cheval ; 16% (v/v) sérum porcin ; 32% (v/v) d'extrait de levure fraîche ; 0,1% (w/v) de nicotinamide adénine dinucléotide et 0,3% (w/v) de thallium d'acétate)	30% de supplément	10% de supplément	10% de supplément	Sans supplément
Complément	Sans complément	20% de 1X MEM α nucléoside	20% de (2% (m/v) NaCl ; 0,52% (m/v) KCl ; 1,2% (m/v) Tris ou 50mM d'HEPES)	0,4 % (m/v) de pyruvate ; 0,02% (m/v) d'ADN
Antibiotique	1g/L d'amoxicilline			

3.2. Conditions de culture :

Les courbes de croissance de la souche Afadé en milieu m-PPLO et APSM à 37°C ont été réalisées à partir d'une dilution d'une préculture en phase stationnaire afin d'obtenir une concentration initiale en mycoplasmes de 10³ cfu/ml. Des suivis de croissance par dénombrement au cours du temps ont été réalisés en triplicat par dépôt de 5µl de différentes dilutions sur milieu gélosé. Les cultures liquides ou gélosés ont été placées dans une étuve à 37°C et sous 5% de CO₂.

Pour la production de VEs, *Mmm* Afadé a été incubé en milieu m-PPLO/ APSM / OptiMEM à 37°C sous 5% de CO₂ et des dénombrements sur milieu gélosé ont été réalisés au moment des prélèvements. Pour les cultures maintenues à pH 6,8 et 7,5 en milieu APSM, le pH a été mesuré tout au long de l'incubation et régulé si besoin, par ajout de NaOH directement dans la culture.

3.3. Isolement des VEs :

Pour l'isolement des VEs, les cultures ont été centrifugées à 14000xg pendant 1 h à 4°C. Le surnageant a ensuite été filtré sur 0,2 µm excepté pour la comparaison de la production en milieu m-PPLO et OptiMEM où le surnageant a été filtré sur 0,1 µm. Le filtrat a été ultra-centrifugé à 100 000xg pendant 2 h à 8°C et le culot obtenu a été remis en suspension puis lavé deux fois dans du PBS 1X. Les vésicules ont été reprises dans du PBS 1X.

3.4. Quantification relative des vésicules ou des protéines sériques:

Le marquage des VEs a été réalisé par l'anticorps 3F3 utilisé à 0,04% (v/v) tandis que le marquage des protéines sériques a été réalisé grâce à l'utilisation de la protéine G (protéine G-péroxydase de *Streptococcus* sp. (Sigma : P8170)) diluée au 1/1000.

Le marquage a consisté en un dépôt de 2µl d'échantillon sur membrane de nitrocellulose. Une fois la goutte imprégnée, la membrane a été bloquée 30 minutes avec du TBS 1X et 10% de sérum de cheval puis l'anticorps 3F3 ou la protéine G ont été ajoutés à la membrane. Celle-ci a été mise sous agitation durant 1h30 à température ambiante. La membrane a été lavée 3 fois 3 minutes avec une solution de lavage constituée de TBS 1X et 0,05% (v/v) tween 20 puis une fois 3 minutes avec du TBS 1X. La membrane a ensuite été incubée 1h30 dans une solution de TBS 1X et 10% de sérum de cheval à laquelle a été ajouté 0,2% d'anticorps anti- IgG de souris couplé à la peroxydase dans le cas du marquage 3F3 (cette étape n'est donc pas réalisée pour le marquage à la protéine G). La membrane a été à nouveau lavée 3 fois 3 minutes avec une solution de lavage constituée de TBS 1X et 0,05% (v/v) tween 20 puis 1 fois 3 minutes avec du TBS 1X (excepté pour le marquage à la protéine G). Elle a ensuite été révélée dans une solution de révélation constituée de TBS 1X, 20% (m/v) de 4-chloro-1-naphthol, 0,02% d'eau oxygénée.

L'intensité du marquage est évaluée à partir du logiciel ImageJ et la fonction « Analyze gels » en comparant les aires générées.

3.5. Purification des vésicules :

Deux types de gradients continu et discontinu ont été utilisés pour la purification et dépendent de la concentration des couches successives. Pour le gradient continu, la variation de densité entre les couches est graduelle alors que pour le gradient discontinu, des couches de diverses densités avec un écart non régulier sont déposées les unes sur les autres.

Le gradient discontinu constitué d'iodixanol (OptiPrep™) a été utilisé selon le protocole de Chernov et ses collaborateurs (Chernov, Mouzykantov et al. 2014). Trois ml d'OptiPrep à 50% (v/v) (dans du PBS 1X stérile) ont été déposés au fond d'un tube (Beckman Coulter ultra-Clear™ de 13 ml). Puis deux couches ont été déposées, la première (2 ml) est constituée de 40% (v/v) d'OptiPrep et a été déposée délicatement par-dessus la fraction 50%. La seconde est une fraction de 10% (1,6 ml) contenant les VEs à purifier et qui a été déposée délicatement en haut du gradient. Le gradient a été ultracentrifugé 3 h à 150 000xg. Après ultracentrifugation, les VEs présentes à l'interface entre les fractions 10 et 40% ont été prélevées puis lavées dans deux fois leur volume en PBS 1X grâce à une ultracentrifugation d'1h30 à 100 000xg.

Le gradient continu en OptiPrep™ est constitué de 6 couches d'iodixanol dilué en PBS 1X stérile. Les vésicules ont été mélangées à une solution composée de 35% d'OptiPrep (1 ml), ou 30% (2 ml) pour les vésicules issues de la comparaison des milieux OptiMEM et m-PPLO et placées au fond d'un tube de 13 ml (Beckman Coulter ultra-Clear™). La couche à 35% est recouverte par une couche à 30% (v/v) (1 ml) (excepté pour la comparaison des milieux OptiMEM et m-PPLO), puis par 1 ou 2 ml d'une couche à 25% (v/v), une à 20% (v/v), une à 15% (v/v) et une à 10% (v/v). Le gradient a été ultracentrifugé à 100 000xg durant 15 – 16 h. Les différentes phases du gradient ont ensuite été prélevées par couche de 500 µl puis analysées par marquage à l'anticorps 3F3 avant d'être lavées dans deux fois leur volume en PBS 1X (ou 30X puis 2X leur volume pour la comparaison des milieux OptiMEM et m-PPLO) grâce à une ultracentrifugation d'1h30 à 100 000xg.

3.6. Dosage des protéines :

Les protéines présentes dans toutes les fractions ont été dosées à l'aide du kit « Pierce™ BCA Protein Assay Kit » (ThermoFisher) selon les instructions du fournisseur. L'absorbance a été mesurée à l'aide d'un lecteur de plaque CLARIOstar (BMG labtech).

3.7. Electrophorèse des protéines :

Les gels utilisés ont été soit des gels pré-coulés Mini-PROTEAN® TGX™ « Any kD™ » (Bio-Rad) suivis d'une coloration au bleu de coomassie Bio-Safe™ (Bio-Rad), soit des gels à 10% réalisés au laboratoire et colorés à l'argent (Thermo Scientific Pierce Silver). Pour le gel de séparation, 10% (m/v) d'acrylamide/bis-acrylamide (29 :1) dans 1,5 M de tampon Tris-HCl à pH 8,8 ont été ajoutés à 0,1% (m/v) de SDS et 0,1% (m/v) de persulfate d'ammonium et de 0,1% (m/v) de TEMED juste avant la polymérisation. Pour le gel de concentration, 3,75% (m/v) d'acrylamide, 0,5M de tampon Tris-HCl à pH 6,8 ont été additionnés à 0,1% (m/v) de SDS, 0,1% (m/v) persulfate et 0,1% (m/v) de TEMED avant la polymérisation. Pour les gels réalisés au laboratoire, 20 µg d'échantillon en tampon Laemmli 1X additionné de 5% (v/v) β-mercaptoéthanol ont été déposés après avoir été portés à ébullition durant 5 minutes. Pour les gels pré-coulés, 7 µl d'échantillon ajoutés à 7 µl de tampon Laemmli 2X + 5% (v/v) de β-mercaptoéthanol ont été portés à ébullition 5 minutes avant d'être déposés sur gel. La migration a été effectuée dans du tampon TGS 1X (Bio-Rad) à 175 V constant pour les gels pré-coulés et 70 V (concentration) puis 175 V (résolution) pour les gels réalisés au laboratoire.

3.8. Microscopie électronique :

Cinq µl d'échantillon ont été directement déposés sur une grille de carbon formvar pendant 2 minutes, puis l'excès de liquide a été absorbé. Les échantillons ont été recouverts avec une goutte de 1% (m/v) de sodium silicotungstate pendant 10 s, l'excès a été enlevé avec un papier filtre. Après un séchage à l'air libre, les grilles ont été observées par un microscope électronique (Philips CM120) utilisé à 80 kV. Le diamètre des VEs a été estimé à l'aide du logiciel ImageJ.

4. Résultats

4.1. Recherche de conditions permettant d'éviter la phase de déclin pour la production de vésicules :

Nos recherches précédentes ont montré que la production de vésicules nécessitait des mycoplasmes viables. Nous avons donc évalué s'il était possible d'augmenter la production de vésicules en maintenant la viabilité des mycoplasmes et ce, en prolongeant la phase stationnaire. Des études antérieures ont montré que le variant TR de *Mmm* Afadé est sensible à l'acidification du milieu de culture et que l'utilisation d'un milieu tamponné permettait de maintenir sa viabilité (Gaurivaud, Lakhdar et al. 2014). Le milieu m-PPLO a ainsi été adapté en remplaçant le 1X-MEM par une solution saline tamponnée (NaCl, KCl et Tris) identique à celle de Chernov et ses collaborateurs (Chernov, Chernova et al. 2011, Chernov, Chernova et al. 2012, Chernov, Mouzykantov et al. 2014) (Tableau 10). Ce nouveau milieu a été appelé milieu APSM (milieu appauvri sans MEM). Dans un premier temps, les courbes de croissance du variant TR en milieu APSM et en milieu m-PPLO ont été comparées afin de vérifier si le milieu tamponné permettait de maintenir la viabilité. La Figure 38 présente la comparaison des courbes de croissance réalisées à partir de 3 cultures distinctes pour chaque condition.

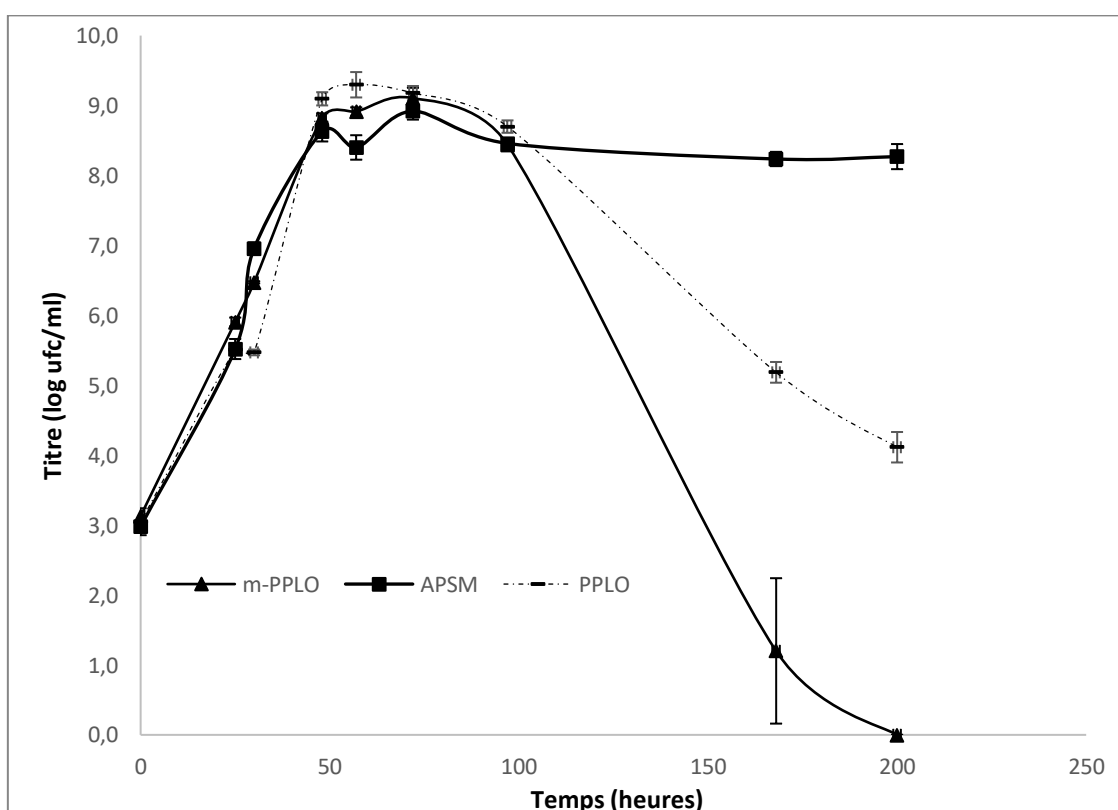


Figure 38 : **Comparaison de la croissance de *Mmm* en milieu m-PPLO et en milieu APSM.** La courbe en milieu PPLO est présentée à titre informatif. Les mesures sont réalisées en triplicat. Les heures sont présentées en abscisses et le titre est exprimé en log d'ufc/ml en ordonnée.

On constate que l'utilisation d'un milieu tamponné permet de maintenir la viabilité même lorsque le milieu est appauvri (concentration en supplément réduite à 10% au lieu des 30% utilisés dans les milieux de cultures classiques). La comparaison des courbes de croissance confirme les résultats obtenus dans d'autres études démontrant qu'un pH stable permet de maintenir la viabilité du variant TR de *Mmm* Afadé durant au moins 200 heures.

Le milieu APSM a donc été utilisé pour la suite des recherches afin d'évaluer si, dans ces conditions, quand le mycoplasme est maintenu en phase stationnaire, il y a une production augmentée de vésicules. L'abondance des vésicules produites à différents temps d'incubation (+48 h, +144 h et +192 h) en milieu tamponné APSM a été comparée à celle observée en milieu appauvri m-PPLO utilisé jusqu'à présent pour la production de VEs. La quantité de vésicules a été estimée à partir d'une approche semi-quantitative, utilisant le marquage 3F3 présentée dans le chapitre précédent. L'intensité des marquages ainsi que les titres mesurés au moment du prélèvement sont présentés dans la Figure 39.

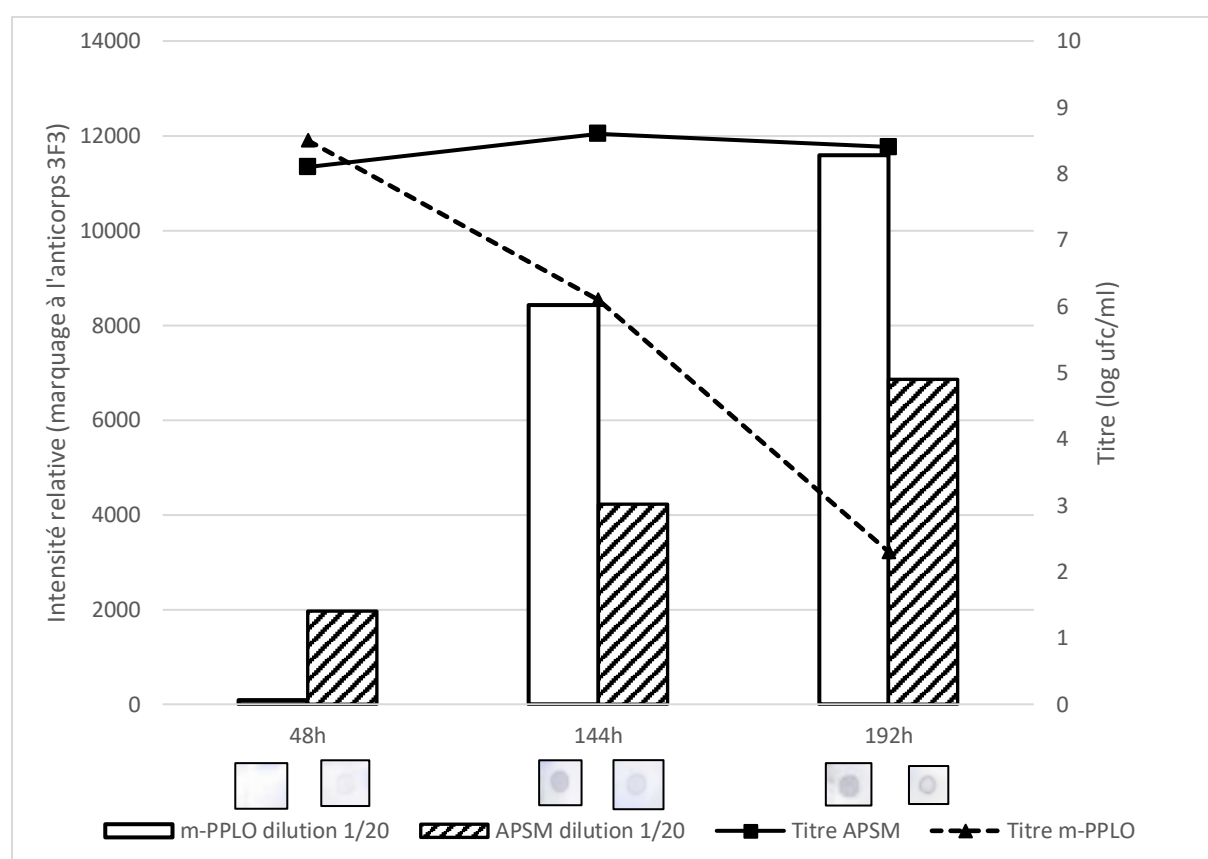


Figure 39 : Comparaison de la production de vésicules extracellulaires en milieu m-PPLO et en milieu APSM. En dessous de chaque barre de l'histogramme est présenté le marquage correspondant réalisé grâce au 3F3.

Le marquage des vésicules montre que la quantité relative de VEs augmente au cours du temps pour les deux conditions m-PPLO et APSM. Dans le milieu APSM, la quantité relative de vésicules augmente graduellement et est observée dès 48 h d'incubation, correspondant au début de la phase stationnaire de croissance. Dans le milieu m-PPLO, la quantité de vésicules observée à partir de 144 h d'incubation (phase de déclin), est déjà plus importante qu'en milieu APSM, cela est également observé à 192 h d'incubation (phase tardive de 8 jours). Le titre en milieu APSM se maintient comme cela avait été observé lors de la comparaison des courbes de croissance. En milieu m-PPLO, le titre chute jusqu'à obtenir un titre de 200 UFC/ml à 192 h d'incubation. Ces résultats suggèrent que l'utilisation d'un milieu tamponné, maintenant la viabilité, ne favorise pas pour autant la production de vésicules par rapport au milieu m-PPLO. Or, nous avons montré précédemment que la production de celles-ci était associée à une viabilité cellulaire, cela suggère que le stress généré dans le milieu APSM (stress nutritionnel où le pH est maintenu) ne permet pas d'induire le même niveau de production de VEs que celui en milieu m-PPLO et que d'autres facteurs pourraient augmenter la production de VEs. Un des facteurs principaux variant entre le milieu m-PPLO et le milieu APSM est la baisse de pH. En effet, l'espèce *Mmm* est une espèce fermentant le glucose et induisant une acidification du milieu. Dans la suite de nos recherches, nous nous sommes donc intéressés à l'impact du pH sur la production de VEs.

4.2. Que se passe-t-il en phase de déclin ?

Une culture de *Mmm* Afadé variant TR a été artificiellement maintenue en milieu APSM à un pH neutre ou à un pH acide. Pour cela, le milieu APSM a été adapté, c'est-à-dire que le Tris (1,2%) utilisé initialement en milieu APSM est remplacé par 50 mM d'HEPES (Tableau 10). Cette modification a dû être réalisée car le pouvoir tampon du Tris se situe dans une gamme de pH 7,2 à 9 tandis que le pouvoir tampon de l'HEPES se situe dans une gamme de pH variant de 6,8 à 8,2. De plus, l'utilisation de l'HEPES est décrite dans la littérature comme adaptée à la culture de *Mmm* et d'autres mycoplasmes (Waite et March 2001). Or, pour cette expérience, nous souhaitons comparer la production de vésicules à partir d'un milieu APSM maintenu soit à pH 7,5, soit à pH 6,8. Le pH 6,8 a été ciblé car il correspond au pH qui pourrait être rencontré dans du surfactant pulmonaire. En effet, celui-ci serait de l'ordre de 6,8 dans l'espace pulmonaire extravasculaire (Effros et Chinard 1969, Verkman, Song et al. 2003). Comme il a été montré qu'en dessous d'un pH 6,5, une mort cellulaire de *Mmm* est observée (Waite et March 2001), l'utilisation d'un pH légèrement supérieur est envisagée pour maintenir la viabilité des mycoplasmes. Les milieux APSM maintenus artificiellement à pH 6,8 ou 7,5 sont également comparés au milieu m-PPLO, milieu « naturellement » acidifié par le métabolisme du glucose de *Mmm*. Ces cultures ont été maintenues 72 heures afin de se placer en phase de déclin là où la production de vésicules a été observée précédemment.

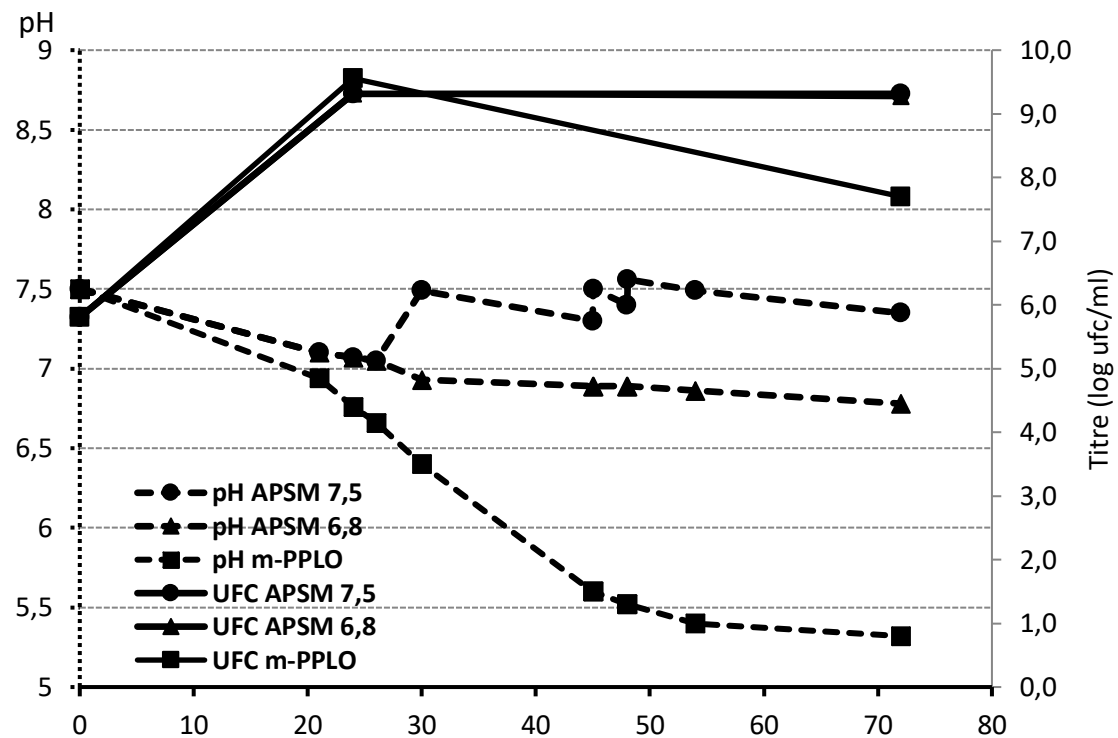


Figure 40 : Titre et pH de *Mmm* en milieu m-PPLO et APSM. Comparaison de l'évolution du pH d'une culture de *Mmm* en milieu m-PPLO et en milieu APSM maintenu artificiellement à pH 6,8 ou 7,5. Evolution du titre exprimé en log dans chacune des conditions. En abscisse est représenté le temps d'incubation exprimé en heures.

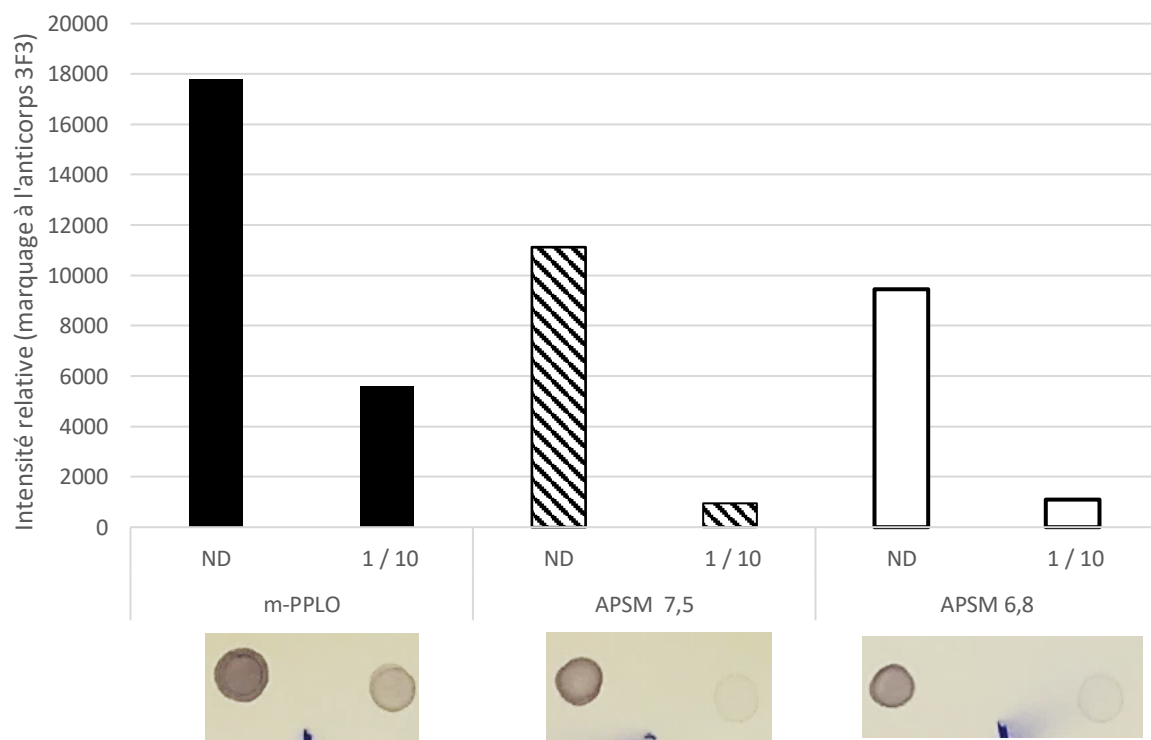


Figure 41 : VEs en milieu m-PPLO et APSM. Intensité de marquage avec l'anticorps 3F3 des VEs prélevés en milieu m-PPLO, APSM maintenu artificiellement à pH 6,8 ou 7,5 après 72 heures d'incubation (Figure 40). Les culots de VEs ont été déposés sans dilution (ND) ou dilués au 1/10.

On constate, à partir de la Figure 40, que lorsque le milieu est artificiellement maintenu à pH 6,8 ou 7,5, le titre augmente, puis se maintient à 10^9 ufc/ml au cours du temps, et ce, jusqu'à 70 heures d'incubation. En milieu m-PPLO, le titre augmente de la même manière qu'en milieu APSM mais ensuite diminue au cours du temps jusqu'à $3,2 \times 10^7$ ufc/ml après 70 heures d'incubation, c'est-à-dire en phase de déclin. On constate qu'en milieu m-PPLO, où le pH est simplement mesuré, celui-ci diminue au cours du temps et passe progressivement de 7,5 à 5,4. Les différents isolats de VEs correspondants au milieu m-PPLO, APSM maintenu à pH 7,5 et APSM maintenu à pH 6,8 ont été déposés sur membrane et marqués à l'anticorps 3F3 (Figure 41). Une saturation du signal est observée lorsque les VEs sont déposées sans être diluées. En effet, une perte de proportionnalité entre le dépôt en m-PPLO non dilué et celui dilué au 1/10 est observée. Par comparaison des isolats dilués au 1/10, on voit que le marquage est plus important lorsque le variant TR est placé en milieu m-PPLO qu'en milieu APSM. Le maintien du pH à 7,5 ou 6,8 ne semble donc pas avoir d'impact sur la production de vésicules.

Les observations par microscopie électronique des VEs en milieu APSM issues d'une culture dont le pH est maintenu à 6,8 ou 7,5 montrent tout de même, une répartition de la taille des vésicules différente.

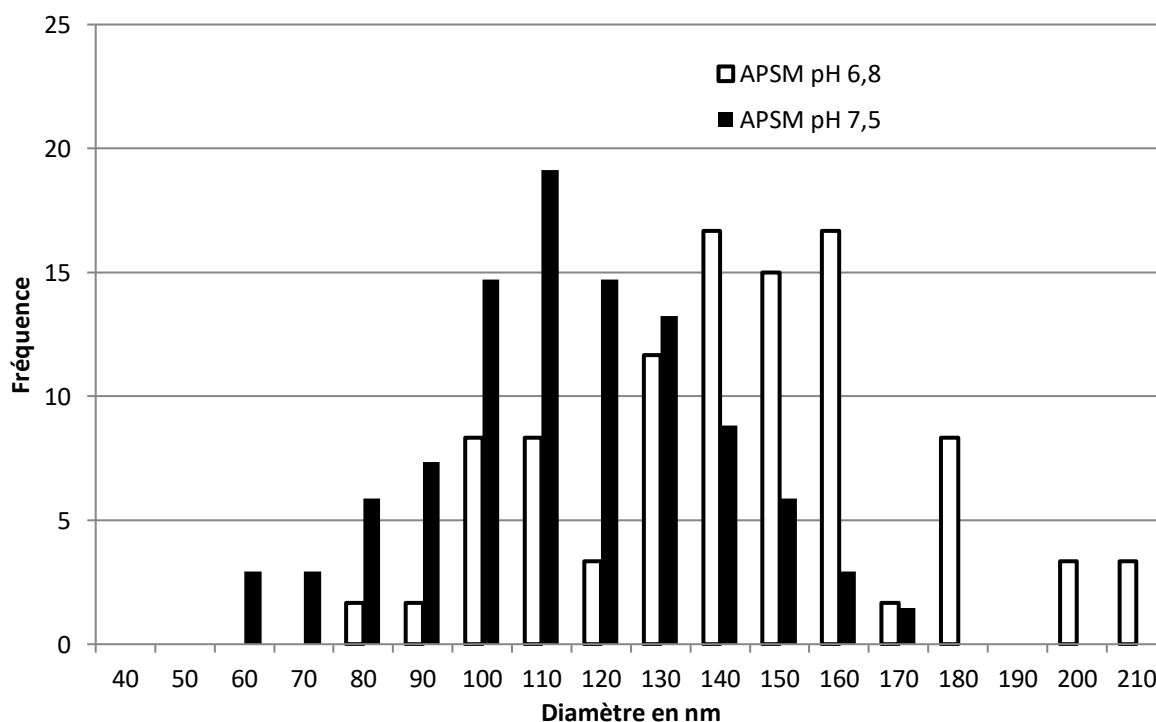


Figure 42 : **Histogramme montrant la répartition de la taille des vésicules issues d'un milieu APSM à pH 6,8 et APSM à pH 7,5.** En abscisse est présentée la taille des VEs et en ordonnée leur fréquence. Soixante VEs ont été observées en milieu APSM à pH 6,8 et 68 à pH 7,5.

Comme le montre la Figure 42, les VEs semblent être globalement plus petites, avec un diamètre moyen de 110 nm lorsque le pH est maintenu à 7,5, qu'à pH 6,8 où le diamètre moyen est de 140 nm. Afin d'évaluer si nous sommes face à deux populations différentes, il nous faut caractériser ces vésicules et leur contenu. Comme la production de VEs est plus faible en milieu APSM qu'en milieu m-PPLO, le milieu APSM ne sera pas utilisé, pour le moment, pour la suite des recherches s'intéressant à la purification de VEs.

4.3. Purification :

Les mycoplasmes sont des bactéries exigeantes, cultivées dans des milieux de culture complexes, supplémentés en sérum et extrait de levure. Afin d'induire un stress nutritionnel, un milieu m-PPLO a été utilisé pour la production de VEs. Ce milieu, bien qu'appauvri en supplément, contient toujours 10% de supplément, et il est donc riche en protéines diverses qui peuvent perturber et compliquer la purification. Afin de pouvoir caractériser le contenu protéique des vésicules, il est nécessaire de mettre au point une approche de purification efficace. Deux approches ont été évaluées au cours de cette thèse.

4.3.1. Purification sur gradient discontinu:

La première approche de purification a consisté en la purification sur gradient discontinu (Chernov, Mouzykantov et al. 2014, Jang, Sweredoski et al. 2014), constitué de 10, 40 et 50% d'OptiPrep™ en PBS. Elle a été évaluée pour purifier les isolats de VEs décrits dans le chapitre II (Partie III, chapitre 1, section 4.2) qui avaient été obtenus à trois temps de croissance différents (phase exponentielle, stationnaire et de déclin) en milieu m-PPLO. Les vésicules ont été déposés en haut du gradient dans la fraction 10%.

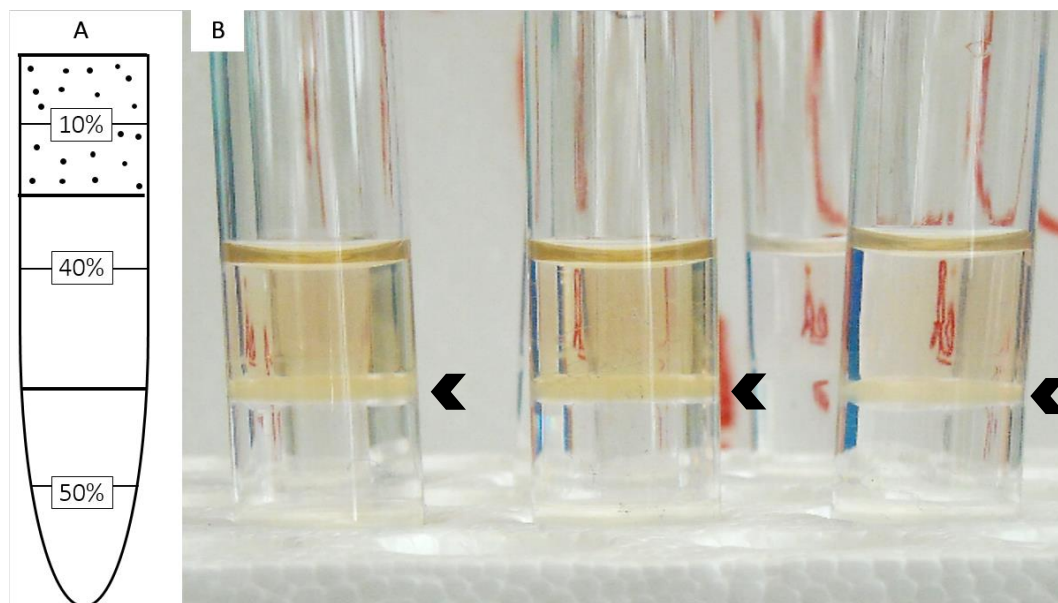


Figure 43 : **Gradient discontinu.** A : Schématisation du gradient discontinu composé des couches 50% d'OptiPrep en PBS, 40% et 10% où sont présentes les VEs. B : Séparation des VEs du reste du surnageant par gradient discontinu. Les flèches noires indiquent la fraction, après centrifugation, où les vésicules sont présentes.

Après centrifugation, une fine couche blanchâtre s'est formée entre les couches 10 et 40% d'OptiPrep (Figure 43). Elle a été prélevée et déposée sur gel SDS-PAGE après dénaturation.

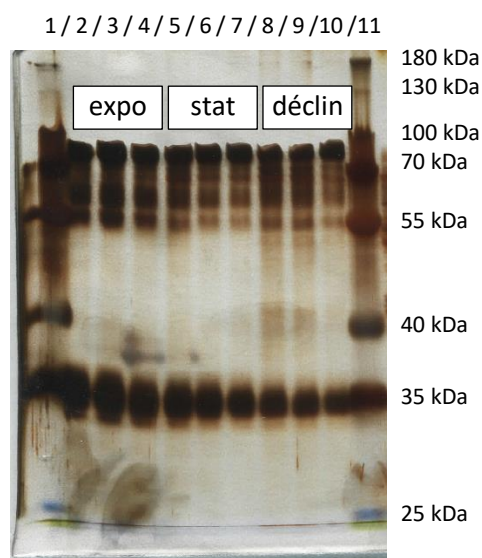


Figure 44 : **SDS-PAGE des VEs isolées après purification sur gradient discontinu** à partir de 3 cultures indépendantes de *Mmm Afadé* en milieu m-PPLO. (Ligne 1 et 11 : marqueur de taille ; 2 à 10 : VEs prélevées en : 2, 3 et 4 : phase exponentielle ; 5, 6 et 7 : phase stationnaire ; 8, 9 et 10 phase tardive).

Nous avons montré plus en amont dans le paragraphe « vésiculation et stade de croissance » (Partie III / Chapitre 1 / section 4.2) par MET et par marquage avec l'anticorps 3F3, que les VEs sont produites principalement en phase de déclin. Nous observons sur la Figure 44 que les profils protéiques sont similaires entre les différents isolats de VEs purifiés issus de phases de croissance différentes. Ce résultat démontre que cette méthode n'a pas été efficace pour éliminer les protéines contaminantes du milieu m-PPLO.

Afin de confirmer cette observation, les VEs purifiées sur gradient discontinu ont été déposées sur membrane et marquées avec la protéine G de *Streptococcus sp.* se liant aux IgG des mammifères.

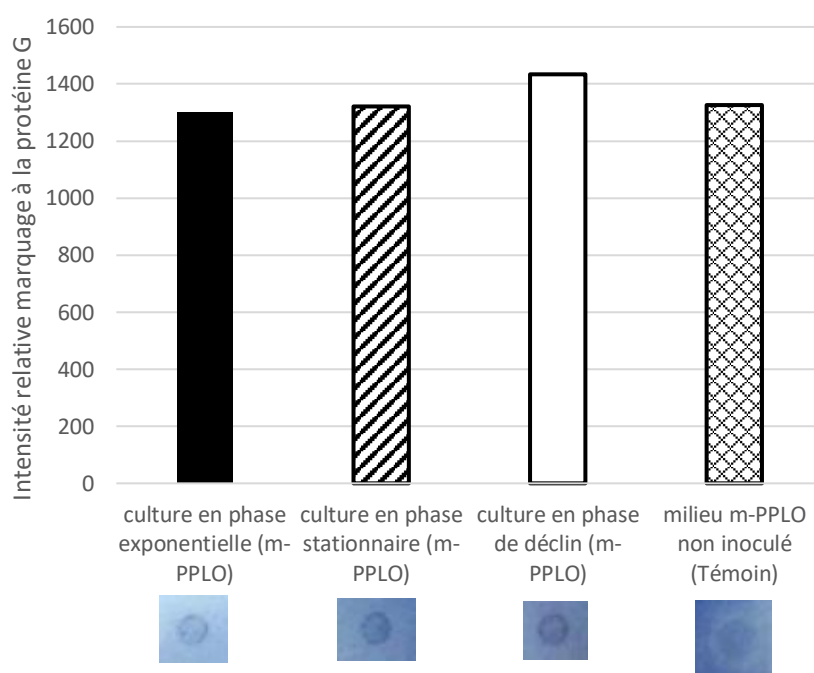


Figure 45 : **Marquage à la protéine G.** Marquage des VEs en milieu m-PPLO ou marquage du milieu de culture non inoculé (Témoin) à la protéine G. Le marquage est équivalent entre les 4 dépôts.

Comme le montre la Figure 45, les VEs purifiées sur gradient discontinu sont toutes marquées par la protéine G. Le marquage est de la même intensité relative que celui du milieu non inoculé. Cela suggère que des protéines sériques de type IgG restent encore présentes dans les culots de VEs en milieu m-PPLO purifiés sur gradient discontinu et donc que notre approche de purification n'est pas satisfaisante.

4.3.2. Purification sur gradient continu:

Une approche alternative a donc été envisagée, elle consiste en l'utilisation d'un gradient de densité continu constitué de 6 couches allant de 35% à 10% d'OptiPrep™. Un culots vésiculaire décrit dans le chapitre II ; (Partie III chapitre 1 ; section 4.2) correspondant à un prélèvement réalisé durant la phase de déclin en milieu m-PPLO, a été mélangé à la couche 35% d'OptiPrep en PBS 1X. Après centrifugation, différentes fractions du gradient (Figure 46) ont été récoltées et une partie a été déposée sur membrane avant d'être marquée par l'anticorps 3F3.

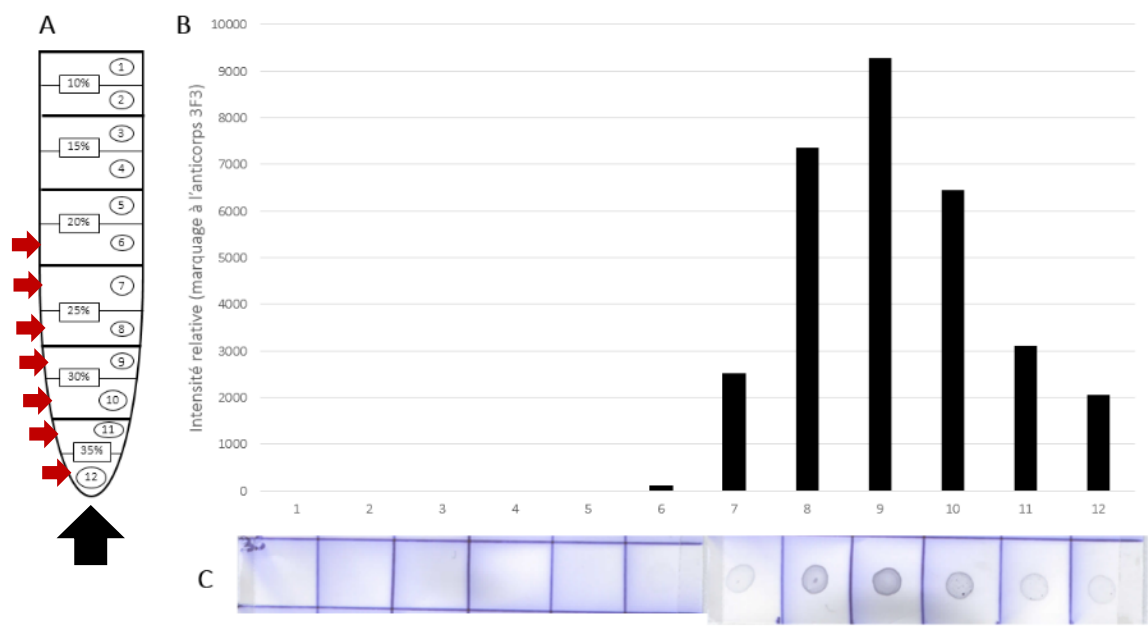


Figure 46: **Marquage au 3F3 des différentes fractions du gradient de densité continu** récoltées après centrifugation. A : schématisation de la répartition des fractions au sein du gradient. Ex : la fraction 1 déposée sur la membrane correspond à la première fraction de la zone 10% du gradient du schéma de droite. La flèche noire correspond à la fraction comprenant le dépôt initial de VEs en milieu m-PPLO et les flèches rouges indiquent les zones où des VEs ont été marquées par l'anticorps 3F3. B : Intensité de marquage au 3F3 en abscisse sont présentées les différentes fractions du gradient. C : dépôt et marquage au 3F3 des différentes fractions du gradient.

On observe qu'avec cette approche, des vésicules sont détectées à partir de la fraction 6 jusqu'à la fraction 12 (Figure 46). Le marquage le plus intense est celui de la fraction 9 du gradient correspondant à 25-30% d'Optiprep en PBS ce qui est en accord avec ce qui a pu être observé chez d'autres bactéries (Chutkan, Macdonald et al. 2013, Abdi, Yu et al. 2017, Wang, Thompson et al. 2018). Les différentes fractions du gradient continu ont ensuite été déposées sur gel SDS-PAGE pour évaluer la quantité de protéines.

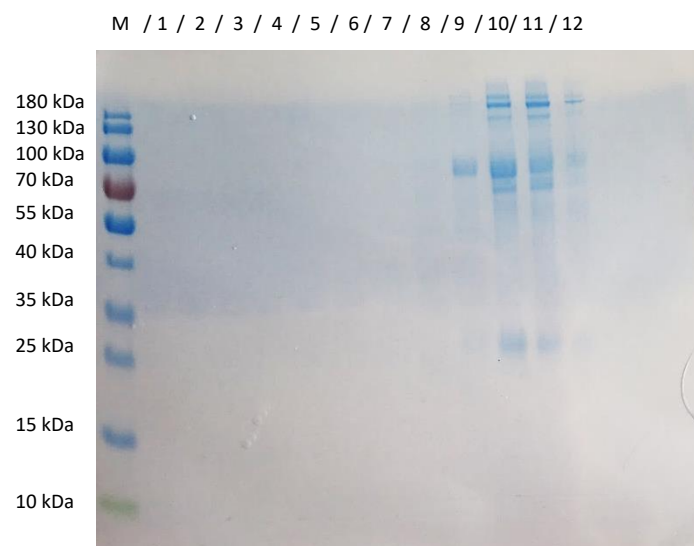


Figure 47: **SDS-PAGE des différentes fractions du gradient continu.** M : marqueur de taille. 1 à 12 : fractions du gradient.

On constate qu'un profil (puits 10 à 13 de la Figure 47) est observé dans les fractions du gradient de densité où un marquage est constaté par l'anticorps 3F3 (fractions 9 à 12) mais qu'aucun marquage n'est visible ailleurs sur le gel. Cela suggère que des protéines sériques ont pu être co-purifiées avec les VEs pour ces fractions de 9 à 12. La fraction 9 du gradient présentant un fort marquage 3F3, a été déposée sur membrane et marquée à la protéine G mais aucun marquage n'est repéré. Elle a ensuite été observée par microscopie électronique (Figure 48).

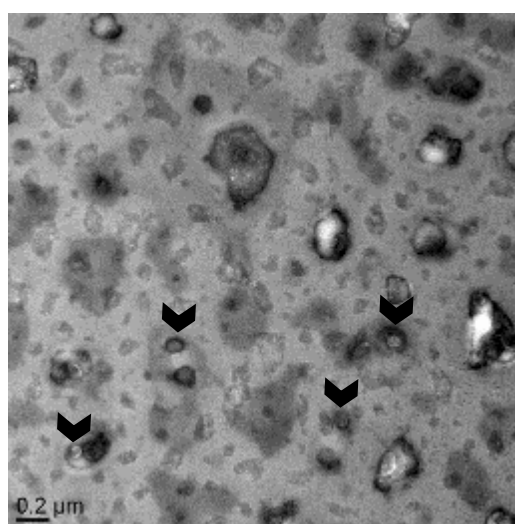


Figure 48: **Microscopie électronique de la fraction 9 du gradient de densité continu.** Les flèches noires suggèrent des exemples de VEs.

Les observations par microscopie électronique mettent en évidence quelques VEs mais aussi la présence d'amas laissant penser à des agrégats hétéroclites qui génèrent un bruit de fond. Celui-ci, même s'il est toujours présent, semble tout de même diminué par rapport aux premières observations par microscopie électronique (exemple : Figure 27). Ce bruit de fond pourrait être dû à un lavage insuffisant des fractions OptiPrep.

4.4. Utilisation du milieu OptiMEM:

4.4.1. Production de vésicules en milieu OptiMEM :

En complément de la purification sur gradient, nous avons évalué l'utilisation du milieu défini OptiMEM qui est dépourvu de sérum et extrait de levure pour la production de VEs par Mmm. Ce milieu n'est supplémenté en peptides que par l'ajout de transferrine et insuline et devrait permettre de faciliter l'étape de purification. Ce milieu a été utilisé dans la partie II pour la caractérisation de protéases extracellulaires chez plusieurs mycoplasmes après 16 h d'incubation et nous avons montré qu'il permettait une bonne survie de *Mmm* (après 16 h d'incubation). Nous avons donc voulu évaluer si des VEs pouvaient être produites en milieu OptiMEM c'est-à-dire en conditions davantage maîtrisées en termes de contaminants protéiques potentiels.

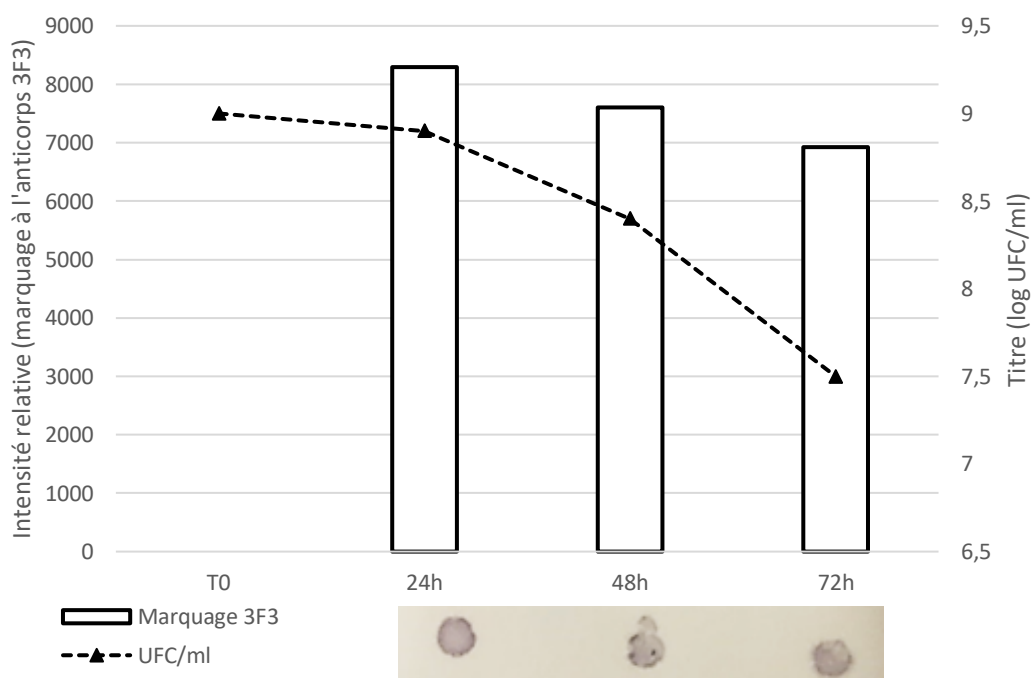


Figure 49: **Production de VEs en milieu OptiMEM.** Intensité relative du marquage 3F3 des VEs extraites à trois temps (+24 h, +48 h et +72 h) à partir d'une culture de *Mmm* Afadé variant TR en milieu OptiMEM et titre associé. Les images des marquages sont placées en dessous de l'histogramme correspondant. A T0 (temps zéro), seul le titre a été mesuré (l'isolement de VEs n'a pas été réalisé)

On observe sur la Figure 49, qu'un marquage est présent dès 24 h d'incubation en milieu OptiMEM. Malgré une baisse du titre au cours du temps, le marquage reste constant, suggérant que dans ce milieu comme en m-PPLO, la baisse du titre n'entraînerait pas une augmentation de la production de VEs.

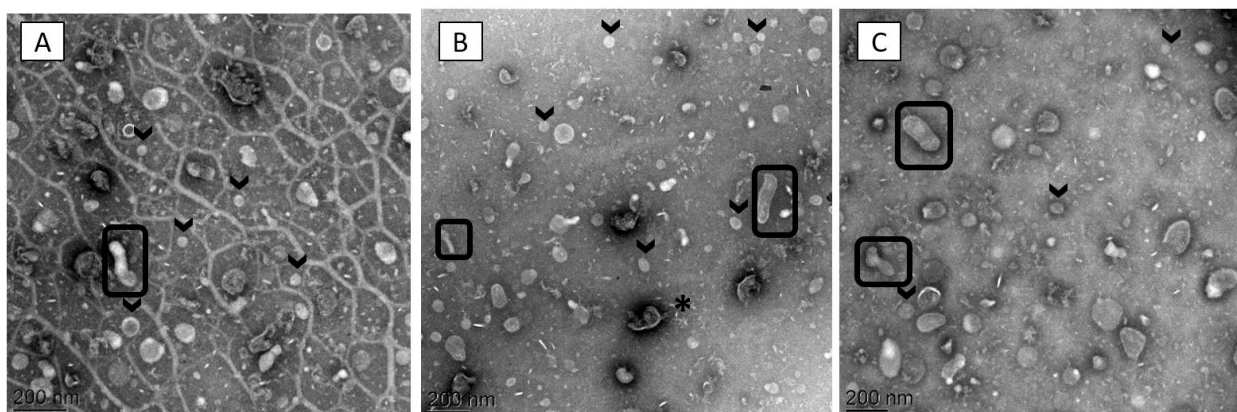


Figure 50 : **Observations par microscopie électronique des VEs obtenues à partir du milieu OptiMEM** après 24 h (A), 48 h (B) et 72 h (C) d'incubation. Les flèches noires indiquent des exemples de VEs. Les encadrés indiquent des exemples de formes allongées ; * : Débris membranaires.

Les images de MET (Figure 50) des prélèvements réalisés à 24, 48 et 72 h montrent la présence de VE mais aussi de débris membranaires et de formes allongées de grande taille. Il semblerait donc que des formes allongées arrivent à passer l'étape de filtration sur 0,22 μ m laissant suspecter la présence de cellules mycoplasmaïques aplaties. De plus, le bruit de fond est toujours présent suggérant qu'une étape de lavage supplémentaire serait encore éventuellement nécessaire.

4.4.2. Comparaison de la production de VEs entre le milieu m-PPLO et optiMEM :

La comparaison de la production des VEs entre ces deux milieux est difficile en raison des propriétés propres de chaque milieu, le milieu m-PPLO permet une croissance du mycoplasme alors que le milieu optiMEM est un milieu de survie. Il n'est alors pas possible d'avoir les même temps d'incubation pour la production des VEs mais les quantités de mycoplasmes lors de l'inoculation peuvent être similaires.

Un même titre initial de mycoplasmes a été utilisé mais le volume de la pré-culture ainsi que le temps d'incubation ont été adaptés en fonction du milieu de culture. Une pré-culture de 45 ml en PPLO a été transférée à 48 h dans 150 ml de milieu m-PPLO et incubée 96 h supplémentaires donc jusqu'en phase de déclin. En revanche, pour le milieu OptiMEM, qui est un milieu de survie plus que de culture, le volume de pré-culture en PPLO était de 150 ml qui ont été transférés à 24 h dans 150 ml d'OptiMEM et incubés 16 h supplémentaires. L'incubation 16 h a été choisie car c'est le temps utilisé pour la production de protéases extracellulaires, suffisamment long pour permettre une sécrétion, tout en maintenant la viabilité de *Mmm*. Les vésicules ont ensuite été purifiées sur gradient continu de densité constitué de 5 fractions allant de 10 à 30% d'Optiprep. L'utilisation d'un gradient constitué de 5 couches au lieu de 6 a été choisi afin d'améliorer la résolution de la séparation de par l'utilisation de volumes plus grands dans chaque fraction (2 ml au lieu de 1 ml). Cette fois, une filtration sur 0,1 µm a été utilisée pour éliminer les éventuels mycoplasmes aplatis observés précédemment et nous avons ajouté une étape de lavage en grand volume (30 ml de PBS) pour savoir si cela améliore la purification. Quatre prélèvements de chaque fraction du gradient ont été déposés sur membrane afin d'être marqués à l'anticorps 3F3 (Figure 51).

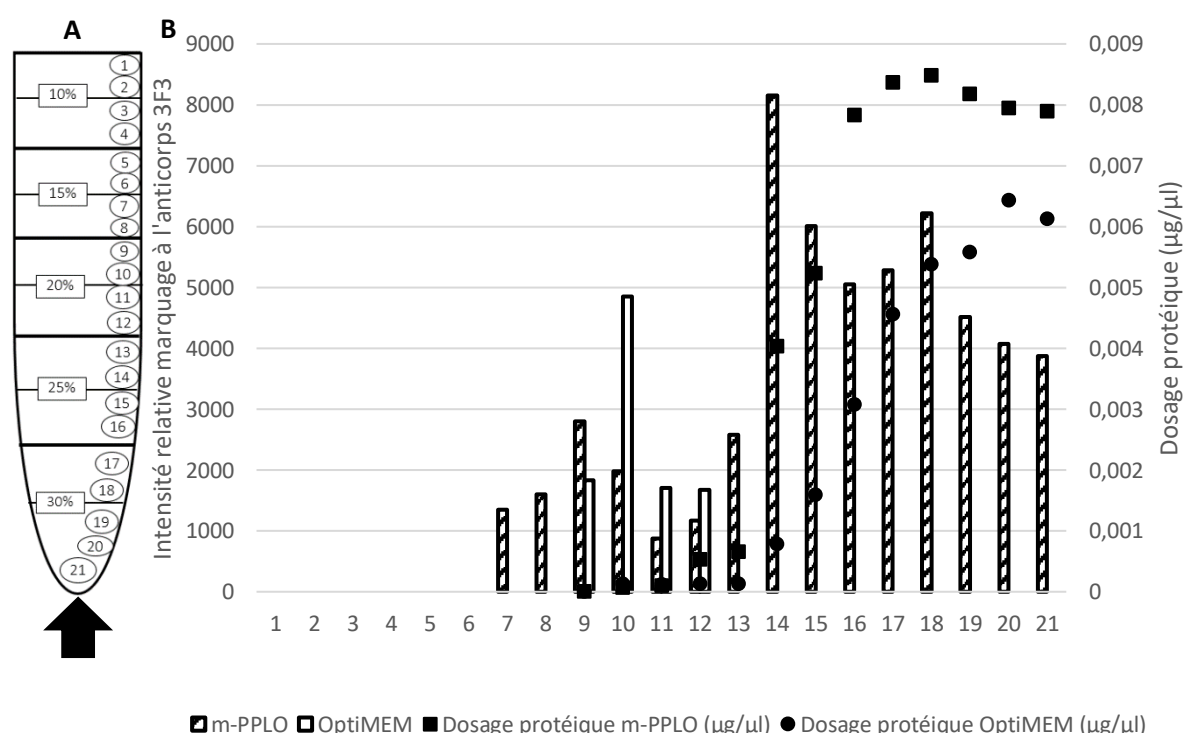


Figure 51: Séparation des VE à partir des milieux m-PPLO et OptiMEM par un gradient continu en Optiprep.

A : Schématisation des différentes fractions du gradient continu. La flèche noire indique la fraction dans laquelle ont été déposées les VE. B : marquage à l'anticorps 3F3 (histogramme m-PPLO et OptiMEM) et dosage des différentes fractions issues d'une culture en milieu m-PPLO ou OptiMEM. En abscisse sont présentées les différentes fractions du gradient et en ordonnée, l'intensité du marquage 3F3 ou le dosage protéique correspondant exprimé en µg/µl.

Comme le montre la Figure 51, le marquage des vésicules issues du milieu OptiMEM est concentré dans 4 fractions (9,10, 11 et 12) correspondant à la fraction 20% d'OptiPrep en PBS tandis qu'en milieu m-PPLO le marquage 3F3 est présent dans les fractions 7 jusqu'à 21. Il est intéressant de constater que le dosage protéique total des différentes fractions est plus important pour les deux milieux dans les fractions les plus concentrées en OptiPrep qui ne sont pas les fractions où le marquage 3F3 est le plus important. Il semblerait donc que le gradient permette de séparer les vésicules des autres protéines du surnageant. A première vue, le milieu OptiMEM permettrait une meilleure séparation et concentration des VEs que le milieu m-PPLO. Ces résultats sont à nuancer par le fait que les vésicules en milieu OptiMEM ont été prélevées après 16 h d'incubation où le titre avait peu évolué (T_0 : $9,1 \pm 0,04$ Log ; $T+16h$: $8,0 \pm 0,07$ Log) et où la production de VEs est peut-être moindre qu'en milieu m-PPLO. En milieu m-PPLO, le temps d'incubation était plus long 96 h et le titre était plus faible qu'en OptiMEM au moment du prélèvement (T_0 : $9,0 \pm 0,02$ Log ; $T+96h$: $6,6 \pm 0,07$ Log). Différentes fractions ont donc été réunies puis observées par microscopie électronique.

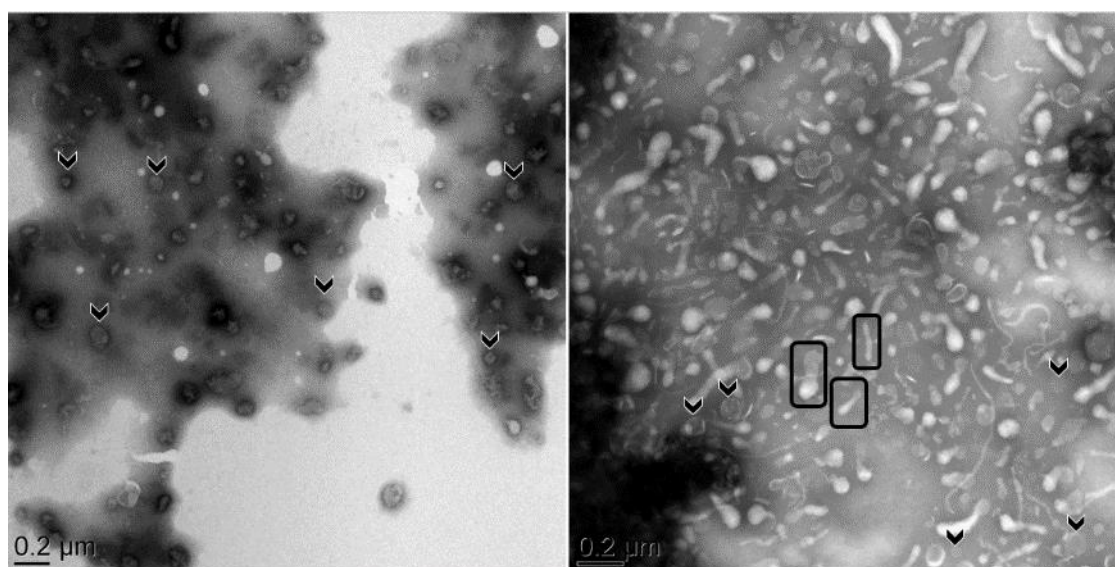


Figure 52 : **Observations par MET des fractions du gradient de densité (OptiMEM et m-PPLO).** A gauche: fraction 9-10 en milieu m-PPLO. A droite : fraction 10-11 en milieu OptiMEM. Les flèches sont des exemples de VEs. Les encadrés indiquent les exemples de formes aplaties.

Ces observations (Figure 52) montrent que la fraction 9-10 en milieu m-PPLO semble contenir des structures sphériques d'une taille vésiculaire en l'absence d'agrégats protéiques. D'autres fractions (comme la 14, Figure 53) semblent avoir concentré les agrégats protéiques.

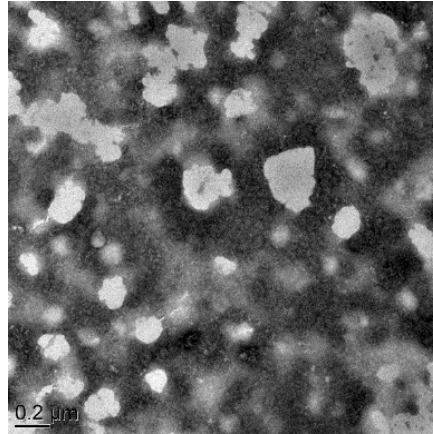


Figure 53 : **Observation par MET de la fraction 14 en milieu m-PPLO** permettant d'observer la présence de contamination protéique.

La fraction 10-11 en milieu OptiMEM (Figure 52) semble être riche mais pas uniquement en vésicules, puisque des formes aplaties sont également observées. Ces formes aplaties ont une taille plus grande qu'une VE et pourraient correspondre à des cellules mycoplasmaïques déformées qui auraient passé l'étape de filtration même sur filtre de 0,1 μm . Pour éviter tout risque de contamination par des cellules entières non viables et dégénérées, le milieu OptiMEM n'a pas été retenu pour la caractérisation du protéome vésiculaire. En revanche, le milieu m-PPLO nous permet d'observer des images constantes depuis le début de son utilisation et le gradient de densité a permis de limiter le bruit de fond observé initialement.

5. Discussion :

5.1. La recherche de paramètres influençant la production de VEs :

Nos recherches précédentes ont montré que les VEs étaient principalement produites en phase de déclin en milieu appauvri en supplément (10% de supplément au lieu de 30%) et que cette production nécessitait des cellules viables. Comme en phase de déclin, une diminution des organismes viables accompagnée d'une potentielle lyse cellulaire est observée, notre objectif était d'évaluer si le maintien d'une culture en phase stationnaire permettait d'augmenter la production de VEs et éviter de complexifier le milieu de culture avec des débris issus de cellules lysées (McCaig, Koller et al. 2013, Klimentova et Stulik 2015). Pour tester cette hypothèse, nous avons tamponné notre milieu de culture en nous appuyant sur les données de la littérature démontrant qu'un pH constant maintenait *Mmm* Afadé variant TR en phase plateau au-delà de 200 h (Gaurivaud, Lakhdar et al. 2014). Nos résultats ont montré que le maintien artificiel d'une phase stationnaire à pH 7,5 en milieu APSM par maîtrise du pH, ne permettait pas d'obtenir plus de VEs qu'en milieu m-PPLO utilisé jusqu'alors. Nous nous sommes donc interrogés sur la nature du stress qui favorisait cette production.

Une des principales différences entre le milieu m-PPLO et le milieu APSM est que le pH du milieu m-PPLO n'est pas maintenu à pH 7,5 puisque la souche *Mmm* acidifie ce milieu par fermentation (Smith et Oliphant 1982, Gaurivaud, Lakhdar et al. 2014). Nous avons montré que le milieu m-PPLO pouvait être acidifié jusqu'à pH 5,4 après 70 heures d'incubation avec la souche *Mmm* Afadé variant TR. Nous avons donc évalué l'impact d'une diminution du pH sur la production de VEs grâce à l'utilisation d'un milieu tamponné à pH 6,8. Ce pH est proche de celui qui pourrait être rencontré dans le surfactant pulmonaire, la sphère respiratoire étant la cible de colonisation par *Mmm* chez son hôte animal (Effros et Chinard 1969, Verkman, Song et al. 2003). Nous avons observé que l'utilisation d'un milieu APSM artificiellement maintenu à pH 6,8 ne permettait pas d'augmenter la production de VEs par rapport au milieu m-PPLO acidifié par la culture. Par ailleurs l'observation par microscopie électronique des VEs produites en milieu tamponné à pH 6,8 ou à pH 7,5 nous a permis de constater que de plus grandes VEs étaient formées en condition acide. Le pH ne semble donc pas favoriser à lui seul la production de VEs mais pourrait favoriser la formation de VEs de tailles différentes. L'observation de plus de champs de microscopie électronique ainsi que de différents pH acide nous permettrait de confirmer si l'acidité favorise la formation de grandes VEs. Une perspective à ce travail serait d'évaluer l'impact d'autres pH et notamment des pH plus acides car dans un microenvironnement touché par un processus inflammatoire, le pH peut varier de 7,0 à 5,5 (Cao, Liu et al. 2015).

Cependant un pH plus acide pourrait favoriser l'apparition de plus de grandes VEs. Pour le moment nous ne connaissons pas leur origine mais elles pourraient résulter d'une division aberrante du fait d'un septum de division excentré puisque le pH maintenu artificiellement à 6,8 est proche du pH 6,5 critique pour *Mmm* (Rodwell et Mitchell 1979, Waite et March 2001). Elles pourraient également être formées suite à une dénaturation des protéines de surface et de leur conformation tridimensionnelle en condition acide ce qui modifieraient les interactions membranaires à l'origine du bourgeonnement. Pour le moment, nous ne pouvons pas statuer sur le rôle du pH dans l'établissement d'une sous-population de VEs de plus grande taille. La caractérisation de ces différentes populations vésiculaires permettra à l'avenir d'évaluer si la modification du pH sélectionne une certaine population dotée d'une composition différente. D'une manière générale, nous ne pouvons pas écarter l'hypothèse que la production de VEs chez les mycoplasmes puisse résulter d'un processus multifactoriel et que le pH n'agisse que sur une partie des VEs ou à un certain stade de la phase de croissance, ce qui complique la mise en évidence d'un lien entre pH et formation de VEs.

5.2. La recherche d'une approche de purification des VEs :

Les mycoplasmes sont cultivés dans des milieux de cultures complexes supplémentés en sérum et extrait de levure donc riches en protéines. Nous avons montré précédemment que même un milieu contenant une concentration moins importante en supplément, ne permettait pas d'éliminer la problématique des protéines contaminantes puisqu'elles génèrent un bruit de fond lors de nos observations par microscopie électronique. Comme ces protéines sont marquées à la protéine G, elles pourraient donc en partie provenir du milieu de culture (sérum, extrait de levure). Or notre objectif était de disposer de VEs purifiées afin de pouvoir s'intéresser à ce qui est contenu dans les vésicules et pour pouvoir *in fine* s'intéresser à leur rôle dans l'interaction avec l'hôte.

L'utilisation d'une approche de purification s'avère donc essentielle pour séparer les VEs des protéines contaminantes et garantir une identification fiable des protéines du cargo. L'approche de purification sur gradient discontinu en OptiPrep (10, 30 et 40%) a été décrite chez *A. laidlawii* (Chernov, Mouzykantov et al. 2014). Nous avons montré que ce type de gradient n'était pas satisfaisant pour la purification des VEs de *Mmm* car de nombreuses protéines restent présentes dans nos isolats de VEs. Nous avons évalué une autre approche de purification consistant en un gradient continu auquel est ajouté une étape de lavage. Avec cette approche nous avons pu réduire considérablement le bruit de fond observé par microscopie électronique suggérant qu'elle reste actuellement l'approche la plus efficace pour limiter les contaminants protéiques. D'autres méthodes de purification décrites dans la littérature pourront être évaluées en complément du gradient continu comme l'exclusion de taille par chromatographie ou l'utilisation de colonne d'affinité. Elles n'ont pour le moment pas été évaluées sur

nos préparations mais pourraient permettre d'augmenter la pureté de nos VEs. Elles soulèvent cependant certaines problématiques car elles ne permettent pas d'analyser de gros volumes de préparation ce qui nécessite d'adapter une étape de concentration. De plus, du matériel vésiculaire pourrait être perdu à chaque ajout d'étape de purification ce qui pourrait favoriser la sélection d'une certaine population vésiculaire et qui nous éloignerait donc de ce qui pourrait exister *in vivo*.

Nous avons évalué l'emploi du milieu défini OptiMEM pour la production de VEs. Ce milieu ne contient que deux protéines, l'insuline et la transferrine ce qui théoriquement permettrait de faciliter et réduire le nombre d'étape de purification des VEs. Ce milieu avait été utilisé dans la partie II pour identifier des protéases dans le milieu extracellulaire. Cependant, nous avons observé que son utilisation pour la production de VEs de *Mmm* n'est pas optimale puisque de nombreuses formes dégénératives sont observées en plus des VEs malgré la filtration sur 0,1µm et l'utilisation d'un gradient. Ces observations évoquent les formes cellulaires allongées décrites chez *M. capricolum* en milieu limité en ADN (Seto et Miyata 1998) (Figure 54). Comme ce milieu ne contient pas de lipides, il pourrait participer à la formation de mycoplasmes dégénérés, non retenus sur un filtre de 0,1µm et contaminant nos isolats.



Figure 54 : **Observation par microscopie électronique (*M. capricolum subsp. capricolum*)**. A: image de *M. capricolum* formant des branches en condition de carence en ADN. Image issue de (Seto et Miyata 1998).

En conclusion les milieux OptiMEM et APSM n'ont pas donné de résultats satisfaisants quant à la production de VEs contrairement au milieu m-PPLO qui pour le moment est le milieu le plus adapté. Cependant l'utilisation d'un milieu défini pour la production de VEs reste une perspective à ce travail puisqu'un milieu défini permettant à la fois la production de VEs mycoplasmique et la culture de cellules de l'hôte permettrait d'évaluer sur modèle cellulaire si *Mmm* produit des VEs.

PARTIE IV

Partie IV : Discussion générale

1. Le sécrétome et voie de sécrétion

Chez les mycoplasmes, la recherche de potentiels facteurs de virulence a principalement porté sur les éléments membranaires (adhésines, toxines...) et peu d'études se sont intéressées aux composés libérés dans le milieu extracellulaire. L'exosécrétome est peu documenté car les milieux de culture mycoplasmiques sont supplémentés en sérum et extrait de levure, ce qui complique toute identification d'exoprotéines. Pourtant cet exoprotéome existe puisqu'une nucléase extracellulaire a été mise en évidence chez *M. bovis* (Zhang, Zhao et al. 2016). Sa présence dans le milieu extracellulaire permet d'envisager que des enzymes mycoplasmiques actives pourraient être sécrétées. Les recherches identifiant toutes les exoprotéines mycoplasmiques suggèrent que de nombreuses protéines pourraient être sécrétées par les mycoplasmes (Rebollo Couto, Klein et al. 2012, Voros, DeLongchamp et al. 2015, Paes, Lorenzatto et al. 2017, Leal Zimmer, Paludo et al. 2019). Cependant ces études ne se sont pas intéressées aux potentielles fonctions des exoprotéines ainsi qu'à leur éventuelle sécrétion via les vésicules extracellulaires.

Dans ce contexte, nos recherches avaient pour objectifs de s'intéresser au sécrétome mycoplasmique et plus particulièrement à deux éléments de l'exosécrétome, les protéases sécrétées et les vésicules extracellulaires pour des mycoplasmes couramment isolés chez les ruminants au niveau respiratoire. Nos résultats ont permis de détecter des protéases actives dans les surnageants de culture de plusieurs espèces mycoplasmiques. Nous avons identifié des protéases dotées d'un motif S41 chez trois espèces appartenant au cluster *M. mycoides*. Avec l'utilisation du mutant Ck-mut de *Mcc* nous avons confirmé que la protéase MCPA_0240 portait bien l'activité caséinolytique observée. L'identification des protéines issues du surnageant de culture de Ck-mut nous a permis d'observer que la sécrétion de plusieurs protéines dans le milieu extracellulaire était significativement réduite chez le mutant. Pour le moment les outils disponibles ne nous permettent pas d'évaluer si cette protéase participe directement à la libération de protéines membranaires. Sans une complémentation du gène muté, il est difficile de s'assurer qu'aucune autre modification se produisant chez le mutant ne puisse participer au phénotype observé ou qu'aucun effet polaire de la transposition n'ait lieu. Par ailleurs, nos recherches ont permis de détecter une activité fibrinolytique chez la souche parentale qui était absente chez Ck-mut. La production d'une protéine recombinante ou la purification de la protéine permettra à l'avenir de s'intéresser à ses potentiels substrats mais également à ses inhibiteurs et son rôle dans l'interaction avec l'hôte.

L'identification de protéases extracellulaires à partir du surnageant mycoplasmaïque a nécessité l'emploi d'un milieu défini. Le milieu riche (PPLO) classiquement utilisé pour la culture des mycoplasmes était inutilisable pour les identifications de protéases extracellulaires par spectrométrie de masse. En effet, notre approche d'identification reposait sur une étape de concentration des protéines du surnageant or une concentration des protéines sériques et protéines de l'extrait de levure aurait masqué les protéines mycoplasmaïques. Nous ne pouvions pas non plus utiliser le milieu CMRL, qui avait été employé lors de l'identification des exopolysaccharides car il ne permet pas de maintenir le titre mycoplasmaïque (Bertin, Pau-Roblot et al. 2013, Bertin, Pau-Roblot et al. 2015). Or une potentielle lyse cellulaire pourrait contaminer le surnageant avec de nombreuses protéines cytoplasmiques ce qui aurait compliqué l'identification d'exoprotéines. Nous avons donc utilisé un autre milieu, le milieu OptiMEM qui présentait deux avantages, (1) il ne contient pas de sérum et (2) il peut être utilisé pour la culture cellulaire, ce qui pourrait être envisagé lors de l'étude des composés sécrétés dans l'interaction avec l'hôte sur des modèles cellulaires. Nous avons pu observer que ce milieu permettait le maintien du titre de plusieurs espèces mycoplasmaïques durant 16 heures et des protéines extracellulaires pouvaient y être détectées. En revanche, nous avons pu observer qu'il n'était pas adapté à toutes les espèces étudiées puisque *M. ovipneumoniae*, *M. arginini* et *M. bovis* ont présenté une baisse de leur titre de plus de 2 log après 16 h d'incubation en OptiMEM. Une alternative pourrait être l'emploi d'un milieu parfaitement adapté et permettant une croissance bactérienne comme celui mis au point par Yus et ses collaborateurs pour *M. pneumoniae* (Yus, Maier et al. 2009). Ce type de milieu pourrait être envisagé chez les mycoplasmes des ruminants mais nécessiterait d'être modifié afin de correspondre à toutes les espèces étudiées. Or nous avons pu observer que certaines espèces sont plus exigeantes que d'autres ce qui nécessiterait de mettre au point plusieurs milieux définis adaptés à chaque espèce. Cette approche serait difficile à mettre en œuvre puisque ce milieu n'est pas durable dans le temps et qu'il nécessiterait l'ajout d'au moins 26 composants, dont des lipides. Une alternative plus réaliste pourrait être l'utilisation du milieu riche PPLO, traité par ultrafiltration sur 10 kDa comme cela a été réalisé par Voros et ses collaborateurs (Voros, DeLongchamp et al. 2015). Dans ce milieu filtré, les auteurs ont montré qu'une légère croissance pouvait être mesurée mais l'observation d'une activité lactate déshydrogénase dans le surnageant de culture laisse suspecter la présence d'une lyse cellulaire (Voros, Dunnett et al. 2009). En effet, dans la littérature cette enzyme est présentée à la surface membranaire (Grundel, Pfeiffer et al. 2015). A cause de cette potentielle lyse, ce milieu n'avait initialement pas été retenu, mais avec le recul de nos recherches et l'identification d'une lactate déshydrogénase dans le protéome vésiculaire membranaire de *Mmm* (MSC_0532), nous pouvons émettre l'hypothèse que cette légère activité présente dans le surnageant puisse en fait être associée à la production de vésicules extracellulaires. Ce milieu de

culture ultrafiltré pourrait donc être une alternative au milieu OptiMEM pour la caractérisation des protéines ou protéases extracellulaires, qui serait adapté à plus d'espèces mycoplasmiques.

Avec un milieu défini il sera notamment possible de différencier l'exosécrétome libre et l'exosécrétome vésiculaire. Nous avons montré que des vésicules extracellulaires (VEs) pouvaient être observées chez plusieurs espèces mycoplasmiques isolées chez les ruminants. Sur une espèce modèle nous avons montré que leur production nécessitait des mycoplasmes viables. La caractérisation du protéome membranaire vésiculaire nous a permis d'identifier de nombreuses protéines. Il pourrait ainsi être envisagé de s'intéresser à la composition en exoprotéines vésiculaires et en exoprotéines libres. Peu d'études se sont intéressées à cette thématique chez les bactéries. Une étude portant sur *P. aeruginosa* a pourtant montré que l'exoprotéome non vésiculaire et les VEs pourraient avoir des fonctions différentes. Les VEs favoriseraient le transport de molécules participant à la communication cellulaire tandis que l'exoprotéome non vésiculaire serait constitué de toxines et autres facteurs de virulence (Reales-Calderon, Corona et al. 2015). Chez les mycoplasmes ce type d'approche n'a pas encore été déployée en raison du verrou technologique associé au milieu de culture. Nos recherches ont montré que le milieu OptiMEM, utilisé pour la caractérisation des protéases extracellulaires, n'était pas satisfaisant pour la production de vésicules puisque des potentiels cellules mycoplasmiques aplaties contaminent nos isolats vésiculaires. Le milieu permettant la production de vésicules (m-PPLO) est quant à lui non idéal à la caractérisation de l'exosécrétome libre puisqu'il reste trop riche en protéines du milieu. Il serait donc nécessaire de disposer d'un milieu permettant à la fois la caractérisation de l'exosécrétome libre et l'exosécrétome vésiculaire.

Nos recherches se sont focalisées sur une partie du sécrétome, l'exosécrétome, mais une perspective logique à ce travail serait de s'intéresser au protéome de surface (surfacéome) ainsi qu'à la machinerie de sécrétion. La caractérisation du protéome de surface pourrait permettre (1) de détecter si des protéines sont spécifiquement enrichies dans les VEs et (2) d'évaluer si des protéines peuvent avoir une double localisation (de surface et extracellulaire), résultat d'une action protéasique de type « shaving ». Chez les mycoplasmes, une seule étude s'est intéressée spécifiquement au surfacéome et a été menée sur *M. hyopneumoniae* grâce à un marquage à la biotine, suivi d'une protéolyse (Reolon, Martello et al. 2014). Ces recherches ont permis de compléter les prédictions *in silico* et de détecter de potentielles adhésines qui pourraient être impliquées dans la virulence par comparaison à celles produites chez un mycoplasme commensal. Au début de cette thèse, nous nous étions intéressés au surfacéome de *Mmm* lors de recherches préliminaires en utilisant une approche de digestion de surface. Ces recherches nous ont montré la complexité à trouver un juste équilibre entre un décapage pas assez efficace, qui ne permettrait pas de détecter des protéines libérées, et un décapage trop important, qui induirait une dégradation des cellules et le potentiel relargage de

protéines cytoplasmiques. Un levier à ce verrou technologique aurait été de disposer d'un marqueur d'efficacité telles que des protéines fluorescentes fusionnées à des protéines de surface du même type que les protéines fluorescentes cytoplasmiques produites chez *Mmm* et *M. bovis* (Bonnefois, Vernerey et al. 2016). Une autre piste pourrait être l'utilisation d'une approche de marquage de surface des mycoplasmes à la biotine, comme utilisée par Reolon et ses collaborateurs (Reolon, Martello et al. 2014).

Le dernier élément du sécrétome qui pourrait être étudié est la machinerie de sécrétion. Une meilleure compréhension de la façon dont les protéines sont sécrétées chez les mycoplasmes pourrait faciliter la caractérisation du sécrétome. La mise en évidence d'un motif de sécrétion porté par les protéines sécrétées pourrait faciliter des recherches *in silico*. La caractérisation des protéines impliquées dans la sécrétion permettrait également d'envisager de les utiliser comme cibles pour le développement d'une stratégie d'antibiothérapie (Craney et Romesberg 2015, Monserrat-Martinez, Gambin et al. 2019). Chez les mycoplasmes, les mécanismes de sécrétion restent énigmatiques et il n'a pour le moment pas été identifié de signal peptidase active. Pourtant des événements de clivage post traductionnel de surface ont lieu, comme cela a été démontré chez *M. hyopneumoniae* où des protéines, comme la P97, sont clivées en de nombreux fragments par une enzyme inconnue (Djordjevic, Cordwell et al. 2004). Nos recherches ont permis de mesurer une activité caséinolytique extracellulaire chez plusieurs espèces appartenant au genre *Mycoplasma*. Cette activité extracellulaire pourrait participer à la libération de protéines membranaires dans le milieu extracellulaire qu'il reste à démontrer et qui nécessiterait la production d'une protéase MCAP_0240 purifiée ou recombinante.

Chez d'autres modèles bactériens, que ce soit chez les Gram+ ou les Gram-, la connaissance des voies de sécrétion et la mise en évidence de signal peptidase, a permis d'utiliser les bactéries comme des outils biotechnologiques produisant des protéines recombinantes d'intérêt pour le milieu pharmaceutique ou industriel. Par exemple, les genres *Escherichia* et *Streptomyces* sont utilisés comme modèles de production car ils sont faciles à manipuler, présentent une croissance rapide et s'adaptent facilement à des milieux peu complexes (Burdette 2018 ; Freudl 2018 ; Anné 2014 ; Belal Hamed 2018). Ce type d'approche n'est pas réalisable avec des mycoplasmes qui n'ont ni une croissance aussi rapide ni un rendement cellulaire et protéique suffisant pour envisager la production de protéines en système industriel. En revanche, les mycoplasmes sont utilisés comme modèle de cellules minimales pour des approches vaccinales. Il s'agit de créer un chassis universel avirulent exprimant à sa surface des antigènes choisis (Mycosynvac <https://www.mycosynvac.eu/>). La connaissance des voies de sécrétion pourrait permettre d'envisager d'utiliser ces mêmes chassis pour la production d'antigènes extracellulaires en interaction avec l'hôte.

2. Interaction avec l'hôte

Au cours de nos recherches nous avons montré que des protéases actives et des VEs pouvaient être identifiées *in vitro* dans le milieu extracellulaire. Chez d'autres micro-organismes, les protéases extracellulaires interagissent avec le système immunitaire inné en perturbant la fibrinolyse, la signalisation inflammatoire, la voie du complément ainsi que la phagocytose (Potempa et Pike 2009). Les vésicules extracellulaires participent à la dissémination de facteurs de virulence et de toxines qu'elles peuvent notamment délivrer aux cellules de l'hôte (Coelho, Brown et al. 2019). En revanche, chez les mycoplasmes, le rôle de ces éléments dans l'interaction avec l'hôte n'est pas connu.

Pour évaluer le potentiel rôle des protéases sécrétées ou des vésicules extracellulaires, l'utilisation de mutants ou de matériels purifiés (vésicules, protéines recombinantes etc..) mis en contact de molécules, de cellules, de tissus ou d'organes *ex vivo* de l'hôte (Hardy, Coalson et al. 2009, Di Teodoro, Marruchella et al. 2018, Raymond, Jenkins et al. 2018) pourrait permettre de mesurer la production de cytokines, l'interaction avec des immunoglobulines ou la capacité de dégradation des cellules et des tissus de l'hôte. Ces systèmes présentent non seulement l'avantage de tester l'effet d'éléments mycoplasmiques ou de mutants mais aussi de rechercher si les molécules étudiées sont sécrétées lorsque le mycoplasme est incubé en présence de cellules ou tissus de l'hôte ce qui permet de replacer les éléments dans le contexte de l'interaction hôte-mycoplasme. L'étape finale restant l'utilisation de modèle animaux afin de tenir compte de la complexité du système immunitaire.

Afin de s'intéresser au potentiel rôle dans l'interaction avec l'hôte de la protéase S41 identifiées dans le milieu extracellulaire, nous aurions pu utiliser le mutant pour la protéase MCAP_0240. Il aurait pu nous permettre d'évaluer si l'absence de cette protéase modifiait l'interaction avec l'hôte. Nous avons par exemple observé que l'activité fibrinolytique était absente chez le mutant contrairement à la souche parentale. Cependant nos recherches ont montré que la sécrétion de plusieurs protéines était altérée chez ce mutant. Il est donc difficile d'évaluer le rôle de la protéase mutée sans l'utilisation d'une protéase MCAP_0240 recombinée ou purifiée. La production d'une protéine (recombinante) purifiée permettrait d'évaluer à la fois le rôle direct de la protéase mais également de déterminer si elle est responsable de la libération d'autres protéines membranaires. Dans ce cas le rôle du système MCAP_0240/protéines membranaires nécessiterait d'être étudié et l'activité fibrinolytique mériterait d'être clarifiée. D'autres substrats pourront ensuite être envisagés qu'ils soient présents dans la matrice extracellulaire ou à la surface de cellules de l'hôte. La dégradation de protéines pourrait permettre à la bactérie d'acquérir des peptides essentiels à son métabolisme ou encore de dégrader certaines protéines de surface de cellules de l'hôte qui pourraient participer à l'immunité (Ma, VanEpps et al. 2017, Pietrocola, Nobile et al. 2017).

Les seconds éléments du sécrétome mis en évidence au cours de cette thèse sont les vésicules extracellulaires. Nous avons montré qu'elles étaient produites par plusieurs espèces du genre *Mycoplasma*. La caractérisation du protéome membranaire des vésicules a permis d'identifier de nombreuses protéines pour lesquelles la capacité d'interaction avec l'hôte a été décrite dans la littérature. Des lipoprotéines ont été identifiées (LppB, p48, p80, P29 etc...), elles sont dotées de propriétés antigéniques et pourraient participer à l'immuno-modulation. Les VEs contenant ces lipoprotéines pourraient donc servir de leurre permettant de diriger la réponse immunitaire loin des cellules productrices qui pourraient ainsi échapper à la réponse immunitaire (Schwechheimer et Kuehn 2015). Parmi les protéines membranaires des vésicules, des adhésines ont également été identifiées comme par exemple la NADH-oxydase (NOX) dont la capacité d'adhésion à des cellules embryonnaires pulmonaires bovines a été décrite (Zhao, Zhang et al. 2017). Il peut donc être envisagé que des vésicules puissent interagir avec des cellules de l'hôte par le biais de ces adhésines. Cette interaction pourrait aboutir à la fusion entre les vésicules bactériennes et les cellules de l'hôte, comme cela est observé chez d'autres micro-organismes (Schwechheimer et Kuehn 2015, Prada et Meldolesi 2016). Ce mécanisme peut être envisagé chez les mycoplasmes et pourrait permettre de libérer le contenu vésiculaire directement chez l'hôte et potentiellement des facteurs de virulence. La caractérisation de ce contenu est donc nécessaire mais nécessite de disposer de matériel purifié. Les VEs purifiées pourraient également être co-incubées avec des cellules ou tissus de l'hôte afin d'évaluer si elles permettent de moduler la production de cytokines ou si elles favorisent la mort de cellules de l'hôte. La principale problématique associée à ces recherches est de disposer de matériel de qualité suffisante, nous avons en effet montré que les protéines issues du sérum sont difficiles à séparer des vésicules. Il est nécessaire d'employer la combinaison de diverses approches de purification, ultracentrifugation, gradient de densité, lavages pour obtenir une fraction vésiculaire contenant peu de protéines sériques. Notons toutefois que l'utilisation de plusieurs étapes de purification pourrait apporter un potentiel biais à nos recherches. Plus les VEs sont purifiées plus il est difficile d'avoir un panel de VEs représentatif de ce qui pourrait exister *in vivo*. Une meilleure compréhension du mécanisme de formation de ces structures permettrait leur production dans des conditions de cultures facilitant leur purification, par exemple en phase exponentielle ou début de phase stationnaire et non comme nous avons pu l'observer, en phase de déclin, pendant laquelle la lyse cellulaire est plus importante. La production de VEs pourrait également être recherchée directement *in vivo* à partir de prélèvements biologiques (ex : liquide d'exsudation). Cependant cela nécessiterait de purifier les VEs pour les séparer à la fois des protéines mais également des exosomes produits par l'hôte, l'utilisation de l'anticorps 3F3 pourrait alors favoriser la purification et l'identification des VEs mycoplasmaïques (Colonne d'affinité, Immunolabelling).

Les mycoplasmes produisent donc un exosécrétome constitué entre autres de protéines, protéase et VEs qui pourrait participer à l'interaction avec l'hôte. Face à l'exosécrétome produit par les mycoplasmes, les cellules de l'hôte sécrètent elles aussi leur propre exosécrétome. Dans le milieu extracellulaire pourraient donc être présentes à la fois des protéines produites par les mycoplasmes et des protéines produites par les cellules de l'hôte. L'étude des exosécrétomes à la fois mycoplasmaux et des cellules de l'hôte est une approche qui a déjà été menée sur des mycoplasmes porcins (Leal Zimmer, Paludo et al. 2019). Elle permet d'identifier des protéines du dialogue moléculaire hôte-mycoplasme. Ces recherches pourraient être réalisées sur des mycoplasmes des ruminants mais pour réaliser cette caractérisation nous devons faire face à la même problématique rencontrée pour la caractérisation de l'exosécrétome mycoplasmaux c'est-à-dire l'obtention d'un milieu défini. En s'appuyant sur les méthodes de purification et de détection mises au point durant ce travail, il pourrait être envisagé de caractériser à la fois les exosécrétomes libres mais également les exosécrétomes vésiculaires participant à ce dialogue moléculaire. De plus, il pourrait être rechercher la présence de protéases fonctionnelles aussi bien produites par les mycoplasmes que par les cellules de l'hôte.

Annexe 1 : Publication « Mycoplasmas are no exception to extracellular vesicles release: Revisiting old concepts

RESEARCH ARTICLE

Mycoplasmas are no exception to extracellular vesicles release: Revisiting old concepts

Patrice Gaurivaud^{1,2*}, Sarah Ganter^{1,2}, Alexandre Villard^{1,2*}, Lucia Manso-Silvan^{3,4}, Didier Chevret⁵, Christelle Boulé⁶, Véronique Monnet⁵, Florence Tardy^{1,2}

1 Université de Lyon, Anses, Laboratoire de Lyon, UMR Mycoplasmoses des Ruminants, Lyon, France, **2** Université de Lyon, VetAgro Sup, UMR Mycoplasmoses des Ruminants, Marcy-L'étoile, France, **3** CIRAD, UMR ASTRE, Montpellier, France, **4** INRA, UMR ASTRE, Montpellier, France, **5** PAPPISO, Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France, **6** Université Claude Bernard Lyon 1, Centre Technologique des Microstructures, Service « Etudes à façon » EZUS Lyon, Villeurbanne, France

✉ Current address: INSERM UMR 1063, Stress Oxydant et Pathologies Métaboliques, Université Bretagne Loire, Angers, France

* patrice.gaurivaud@anses.fr



OPEN ACCESS

Citation: Gaurivaud P, Ganter S, Villard A, Manso-Silvan L, Chevret D, Boulé C, et al. (2018) Mycoplasmas are no exception to extracellular vesicles release: Revisiting old concepts. PLoS ONE 13(11): e0208160. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208160>

Editor: Catherine A. Brissette, University of North Dakota School of Medicine and Health Sciences, UNITED STATES

Received: September 28, 2018

Accepted: November 13, 2018

Published: November 28, 2018

Copyright: © 2018 Gaurivaud et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: Sarah Ganter's PhD research is jointly funded by the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety (Anses) and the French Agricultural Research Centre for International Development (CIRAD). The funder had no role in study design, data collection

Abstract

Release of extracellular vesicles (EV) by Gram-negative and positive bacteria is being frequently reported. EV are nano-sized, membrane-derived, non-self-replicating, spherical structures shed into the extracellular environment that could play a role in bacteria-host interactions. Evidence of EV production in bacteria belonging to the class *Mollicutes*, which are wall-less, is mainly restricted to the genus *Acholeplasma* and is scanty for the *Mycoplasma* genus that comprises major human and animal pathogens. Here EV release by six *Mycoplasma* (sub)species of clinical importance was investigated. EV were obtained under nutritional stress conditions, purified by ultracentrifugation and observed by electron microscopy. The membrane proteins of EV from three different species were further identified by mass spectrometry as a preliminary approach to determining their potential role in host-pathogen interactions. EV were shown to be released by all six (sub)species although their quantities and sizes (30–220 nm) were very variable. EV purification was complicated by the minute size of viable mycoplasmal cells. The proteins of EV-membranes from three (sub)species included major components of host-pathogen interactions, suggesting that EV could contribute to make the host-pathogen interplay more complex. The process behind EV release has yet to be deciphered, although several observations demonstrated their active release from the plasma membrane of living cells. This work shed new light on old concepts of “elementary bodies” and “not-cell bound antigens”.

Introduction

Extracellular vesicles (EV) are nano-sized, membrane-derived, non-self-replicating, spherical structures shed into the extracellular environment by both eukaryotic and prokaryotic cells

and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

[1]. Most prokaryotic EV studied since the earliest observations in the 1960s [2] are Gram-negative outer membrane vesicles [3]. Their composition, biogenesis and role in bacterial virulence and cross-talk with eukaryotic cells have been deciphered in various bacterial models [4]. In contrast, EV from Gram-positive bacteria have been poorly characterized up to now even though they were first observed by electron microscopy in a *Bacillus* culture as early as 1990 [5]. The first characterization of EV released by a Gram-positive bacteria came from the seminal study of *Staphylococcus aureus* in 2009 [6] and, since then, EV have been described in several Gram-positive genera, such as *Bacillus*, *Streptomyces*, *Listeria*, *Clostridium* and *Streptococcus* [7–11]. In the absence of an outer membrane, Gram-positive EV are formed from the cytoplasmic membrane. Hence the thick peptidoglycan cell wall is certainly a physical barrier that could hinder their release and explain the low yield of EV production from Gram-positive bacteria *in vitro* [12].

Within the Gram-positive phylum, bacteria belonging to the class *Mollicutes* hold a special place as they are wall-less, minute-sized cells limited only by a cytoplasmic membrane. They evolved from a common Gram-positive ancestor with a low G+C content and are phylogenetically close to *Clostridium* spp. [13]. The genetic relatedness with the EV-producing *Clostridium* genus [7] and the lack of a cell wall physical barrier are two reasons why we could expect EV production from *Mollicutes*. This was indeed demonstrated by Chernov and collaborators in 2011 using *Acholeplasma* (A.) *laidlawii* as a model [14]. *A. laidlawii* is a filament-shaped mollicute (0.5 µm wide, 2.0 µm long [15]), widespread in nature. The EV observed by electron microscopy from a culture grown under starvation conditions were 70 to 120 nm in length [14] and contained DNA, RNA as well as several proteins some of which could be involved in *Acholeplasma*-plant interactions [14, 16]. The same group also observed vesicles from *Mycoplasma* (M.) *gallisepticum* by atomic force microscopy but did not characterize them further [14].

Although they belong to the same *Mollicutes* class, bacteria from the genus *Mycoplasma* differ from those of the genus *Acholeplasma*. They are spherical, 0.3 to 1.0 µm in diameter [15] and carry a smaller genome (580–1350 kbp for mycoplasmas versus 1500–1650 kbp for acholeplasmas). Furthermore, unlike acholeplasmas, their membrane is rich in cholesterol that has to be provided by their growth environment as they are not able to synthesize it. Finally, whereas *Acholeplasma* species are most often regarded as opportunists, *Mycoplasma* species include several important pathogens for humans and animals. Hence, their capacity to produce EV might be of interest in terms of host-pathogen interactions.

The aim in the present work was to investigate EV release by several *Mycoplasma* species. A nutritional stress was applied to stimulate EV production and the general method recommended for EV purification was used and validated on the *A. laidlawii* model. Six *Mycoplasma* (sub)species, including pathogens of both human and animal origin, were shown to produce EV under nutritional stress. *In vitro* tests showed that EV are produced by living mycoplasma cells and are neither the result of dead cell lysis nor of aberrant cell division process. Proteomic analyses further revealed that EV-membranes contained proteins potentially involved in host-pathogen interactions.

Material and methods

Strains and culture conditions

The *Acholeplasma* and *Mycoplasma* species and strains used in this study are listed in Table 1. Of note for *M. mycoides* subsp. *mycoides* strain Afadé, only the TR-variant was used because i) it has no polysaccharide capsule, which is expected to facilitate EV release and ii) it expresses constitutively the glucose permease (MSC_0860) recognized by the 3f3 monoclonal antibody,

Table 1. List and main characteristics of strains used for EV preparation. Follow-up and quality control of EV production.

Phylogenetic groups	Species/subspecies	Strains	Main hosts	Clinical signs	CFU/ml in m-PPLO ^a			EV preparation	
					0h	24h	48h or 96h	Density ^b	Cell contamination ^c
Phytoplasma, Achleplasma	<i>A. laidlawii</i>	PG8 ^T	Vertebrate and invertebrate	none	2.1 +/-0.6x10 ⁹	1.0 +/-0.8x10 ⁹	(96h) 3.5 +/-2.4x10 ⁷	+	56/1.8x10 ¹⁰
Spiroplasma	<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i>	Afadé ^d	Cattle	Contagious bovine pleuropneumonia	9.8 +/-1.7x10 ⁸	3.2 +/-0.8x10 ⁹	(96h) 4.9 +/-4.3x10 ⁷	++	0/2.5x10 ¹⁰
	<i>M. mycoides</i> subsp. <i>capri</i>	PG3 ^T	Goat	Contagious agalactia	8.4 +/-0.4x10 ⁸	4.8 +/-0.9x10 ⁹	(48h) 3.4 +/-0.0x10 ⁸ (96h) 9.5 +/-2.2x10 ⁴	+/-	1224/3.4x10 ¹⁰
	<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i>	L15937	Goat	Contagious agalactia	1.6 +/-0.2x10 ⁹	2.3 +/-0.4x10 ⁸	(48h) 8.6 +/-0.3x10 ⁶ (96h) 1.1 +/-0.6x10 ⁵	+	0/8.6x10 ⁸
Hominis	<i>M. agalactiae</i>	L14628	Alpine ibex	Pneumonia	3.9 +/-0.2x10 ⁸	3.5 +/-0.8x10 ⁹	(96h) 5.6 +/-0.3x10 ⁸	+	UC/5.6x10 ¹⁰
		5632	Goat	Contagious agalactia	1.5 +/-0.2x10 ⁹	2.6 +/-0.4x10 ⁸	(96h) 2.2 +/-0.0x10 ⁸	+	624/1.1x10 ¹¹
	<i>M. fermentans</i>	PG18 ^T	Human	Found associated with various diseases and clinical syndromes	2.1 +/-0.3x10 ⁸	4.4 +/-0.6x10 ⁸	(96h) 2.0 +/-0.0x10 ⁶	+++	0/2.0x10 ⁸
	<i>M. bovis</i>	L15762	Cattle	Bovine respiratory complex disease	9.3 +/-1.5x10 ⁸	2.0 +/-0.5x10 ⁹	(96h) 1.9 +/-0.1x10 ⁶	+	1068/1.9x10 ⁸

^a Data correspond to mean +/- standard deviation of 3 cell counts, except for *M. mycoides* subsp. *mycoides* for which data correspond to mean +/- standard deviation of the three batches *i.e.* 9 cell counts.

^b EV density in electron micrographs was estimated using the following scale: +/-, counts <1 EV/ 5μm²; +, 1–10 EV/ 5μm²; ++, 10–100 EV/ 5μm²; +++ >100 EV/ 5μm².

^c Total number of CFU in EV extract / number of CFU at 48h or 96h (CFU/ml x volume of m-PPLO medium used for EV preparation)

^d the non-capsulated variant TR was used in this study (see [Material and methods](#))

UC, uncountable; T, type strain.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208160.t001>

which is used as a marker (see hereafter) [17]. They were propagated at 37°C under 5% CO₂ in complete mycoplasma medium (PPLO) composed of a base (mycoplasma broth base 1.4% (w/v), tryptose 1.0% (w/v), yeast extract 0.3% (w/v), glucose 0.1% (w/v)), adjusted to pH 7.6, with addition of 30% supplement (horse serum 48% (v/v), pig serum 16% (v/v), fresh yeast extract 32% (v/v), cysteine 0.1% (w/v), NAD 0.1% (w/v), thallium acetate 0.3% (w/v)). For EV production the PPLO broth was modified (m-PPLO) by reducing the supplement fraction to 10% and adding 20% of 1X MEM α nucleoside (ThermoFisher) to the final medium to ensure substantial serum depletion (from 19% to 6%) without modifying the osmotic pressure. The supplement used for m-PPLO preparation was previously ultracentrifuged at 100 000g for 15h at 8°C in order to deplete potential exogenous eukaryotic extracellular vesicles. The PPLO and m-PPLO media were supplemented with amoxicillin 1g/l. Viable cell concentrations (cfu/ml) were determined by plating serial dilutions of liquid cultures onto PPLO agar plates. Each count was done in triplicate.

M. mycoides subsp. *mycoides* strain Afadé variant TR was further used as a model to investigate the link between cell viability and EV production. Firstly, mycoplasma cells from a 24h-culture in m-PPLO medium (10⁹ cfu/ml) were harvested (12000 g, 20 min, 18°C), resuspended in PBS and one half of the cells were incubated at 60°C for 1 hour while the other was incubated at room temperature for 1h. Cells from both batches were inoculated in m-PPLO medium and further incubated for 72h at 37°C before vesicles extraction and cell counts. In

the second experiment, a 24h-culture (10^8 cfu/ml) was divided into two batches. One of the batches was supplemented with 200µg gentamicin/ml (a concentration known to be mycoplasma-cidal [18]). A further 72h incubation at 37°C was performed before vesicles purification (see hereafter). The relative concentration of vesicles was estimated by electron microscopy and/or 3f3 immunobinding [19].

Isolation of extracellular vesicles

Acholeplasma and *Mycoplasma* strains were first cultivated in PPLO broth for 48h at 37°C, 5% CO₂. Cells were harvested by centrifugation (12000g, 30min, 20°C), suspended in m-PPLO broth and further incubated at 37°C for 4 days, except for *M. mycoides* subsp. *capri* and *M. capricolum* subsp. *capricolum*, which were incubated for 2 days. Cells were removed by centrifugation at 14000g for 1h at 4°C and the supernatants were sterilized by filtering through 0.22 µm PVDF membranes. The filtrates were then concentrated 4-fold with Vivacell 70 MWCO 100 kDa (Sartorius). EV were collected after ultracentrifugation at 100 000g for 90 min at 8°C, then washed and suspended in 100 µl sterile PBS (10 mM phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.8). All EV preparations were stored at -80°C and all further manipulations were carried out at 4°C. The absence of viable mycoplasma cells in EV preparations was ascertained by plating 25 µl (i.e. ¼) of the EV preparation onto PPLO agar plates.

Transmission electron microscopy (TEM) observation

The 200-mesh copper grids coated with Formvar-carbon were glow-discharged, and 5-µL samples were directly loaded onto the grids for two minutes before absorbing the liquid excess. The samples were then negatively stained by floating for 30 seconds on a drop of 1.0% (w/v) sodium silicotungstate. After air drying, images were acquired using a Philips CM120 TEM operated at 80 kV. EV diameter was determined using ImageJ software [20]. The mean EV density per (sub)species was estimated from the number of vesicles observed in ten 5 µm² squares.

EV membrane proteomics

Since EV-protein quantification was biased by the presence of proteinaceous contaminants that co-purify with EV despite PBS washing (as observed in electron micrographs, see for example S2 Fig), EV-membrane proteins were extracted from 50µl of each EV preparation batch using Triton X-114 phase partitioning [21]. Proteins in the detergent phase were precipitated with methanol and chloroform, resuspended in Laemmli buffer and boiled for 5 min. Samples were electrophoresed on a miniprotein Any kd TGX gel (Bio-Rad) at 150 V for 5 min. The gels were stained with blue-safe staining from Bio-Rad according to the supplier's instructions. Gel bands were excised and washed with DTT and iodoacetamide. In-gel tryptic digestion was performed overnight with 100 ng of trypsin (sequencing grade from Promega) in bicarbonate buffer 6h at 37°C. Peptides were extracted with 5% formic acid in water/acetonitrile (v/v), dried and suspended in 25µl of 0.1% formic acid (v/v) and 2% acetonitrile (v/v). LC MS/MS analyses were performed using an Ultimate 3000 RSLC system (Dionex) connected to a LTQ orbitrap mass spectrophotometer (ThermoFisher) by a nanoelectrospray ion source.

All MS/MS spectra were searched against Uniprot databases (*Mycoplasma* (*M.*) *mycoides* subsp. *mycoides* PG1^T (Uniprot proteome identifier UP000001016, version 2013/10/11, 978 entries), *M. agalactiae* PG2^T (Uniprot proteome identifier UP000007065, 11/04/2017, 726 entries) and *M. fermentans* PG18^T (Uniprot proteome identifier UP000006810, 13/05/2017, 1091 entries) by the X!TandemPipeline (open source software developed by PAPPISO, version 3.4.3 [22]). The identified proteins were filtered using E-values $<10^{-4}$ for proteins and <0.01

for peptides with a minimum of 2 peptides. A protein abundance index (PAI) was calculated for each protein in each sample using a relative quantification method, based on spectral counts. PAI, which reflects the relative abundance of the different proteins in each sample, is defined as the number of fragmentation spectra assigned with a significant score divided by the number of observable peptides per protein [23]. Membrane proteins, *i.e.* lipoproteins and transmembrane proteins were identified using Uniprot annotations and TMHMM2.0 prediction [24]. Other proteins were identified as either cytoplasmic or membrane-bound in reference to functional data but in the absence of characteristic structural features.

Results & discussion

Validation of our in-house experimental procedure for EV production

The nutritional stress applied to mycoplasma cultures involved growth in m-PPLO medium, which was partially-depleted in animal serum and fresh yeast extract to reduce the quantities of cholesterol, lipids, peptides, vitamins and nucleotides available for cell division. *A. laidlawii* strain PG8^T was used as a control to validate our capacity to induce EV formation and perform purification. Cells were first cultivated in complete mycoplasma medium (PPLO) until the end of the log phase and then transferred to m-PPLO at a concentration of 10⁸–10⁹ cfu/ml for further incubation (Table 1). The titer of viable *Acholeplasma* cells remained steady for at least 24h and dropped to 10⁷ cfu/ml at 96h (Table 1). EV were purified from the 96h-supernatant by ultracentrifugation and observed by TEM. The sizes ranged from 50 to 150 nm, with a few elements >150nm (Fig 1), consistent with the observations by Chernov and collaborators [14], and an estimated density of 5 EV/ 5 μm² field. The same experimental conditions were then tested on *M. mycoides* subsp. *mycoides* (*Mmm*) strain Afadé used as a representative of the *Mycoplasma* genus. Three different EV batches were prepared to assess the reproducibility of the technique. The viability of *Mmm* strain Afadé in m-PPLO was similar to that of *A. laidlawii* strain PG8^T over time (Table 1). EV were observed for each production batch, with similar sizes ranging from 60 nm to 170 nm (with a few elements >170nm; Fig 1), and a density of around 30 EV/ 5 μm² field (Table 1). Hence, our in-house experimental procedure confirmed the capacity of *A. laidlawii* PG8^T to produce EV and demonstrated for the first time and in a reproducible manner the production of EV by *Mmm* strain Afadé.

Because the diameter of the largest EV (from 170 to 220 nm in Fig 1) was very close to that of viable mycoplasma cells (from 300 to 1000 nm [15]) that could get smaller in nutritional stress conditions [25], the presence of viable cells in our EV preparations was checked by plating a quarter of each preparation on PPLO agar medium. No viable cell was detected in any production batch of *Mmm*, indicating that the largest EV are not small viable cells that could have been co-purified with EV, whereas 14 cells of *A. laidlawii* were found which corresponded to 56 cells in the whole batch (Table 1). Although this cell contamination was very limited (56 cells out of 1.8x10¹⁰ cfu in the whole culture after 96h incubation), it might affect the characterization of EV composition, notably regarding DNA/RNA content that relies on PCR amplifications. In consequence, we chose i) not to use a 0.1 μm filtering step that could potentially minimize cell contamination but might also retain some of the largest EV and ii) to systematically ascertain the quality of our EV preparation batches by performing a sterility control.

Microscopic observations of a *Mmm* Afadé culture in m-PPLO medium before EV purification showed a huge dispersion of spherical elements, including cells, and a clear overlapping area corresponding to EV (S1 Fig). Our EV isolation process resulted in a neat enrichment of the 60–170 nm EV and a depletion of the largest EV (170–220 nm, 3% in the EV preparation versus 13% in the *Mmm* culture; S1 Fig). Early microscopic observations showed membrane-

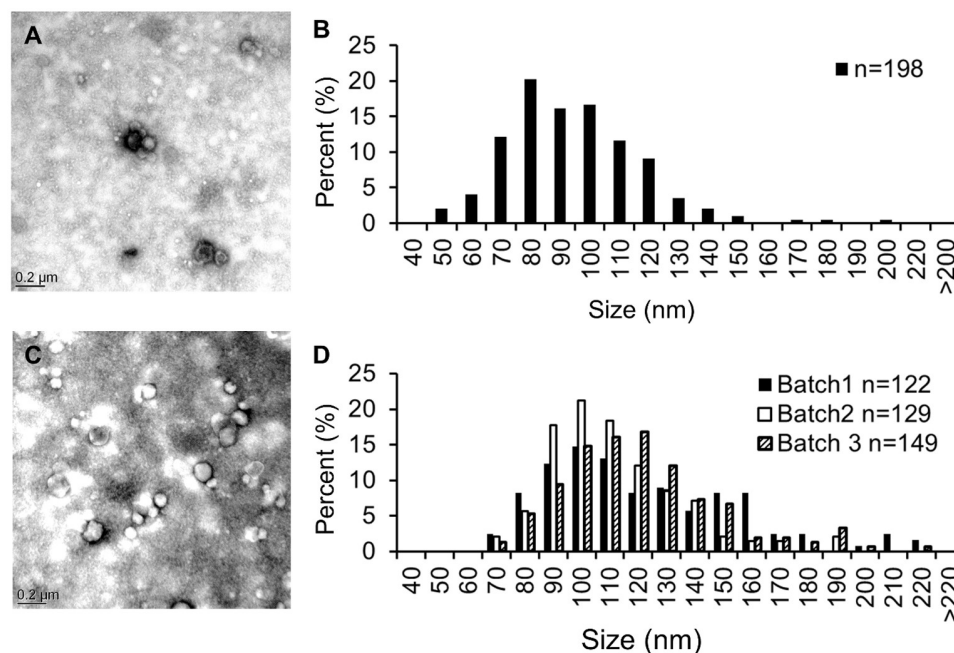


Fig 1. Electron micrographs (A, C) and size distributions (B, D) of negatively-stained EV purified from *Acholeplasma laidlawii* PG8^T (A, B) and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Afadé (C, D). EV diameters were estimated using Image J on $n = 198$ vesicles from *A. laidlawii* PG8^T and $n = 122, 129$ and 149 vesicles from *M. mycoides* subsp. *mycoides* Afadé, corresponding to three production batches.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208160.g001>

surrounded vesicles (100–200 nm) named “elementary bodies” for several *Mycoplasma* species [26]. Such observations were confirmed by Robertson et al. on an aging culture of *M. hominis* in which small cell-like bodies (100–250 nm) associated in 0.22 μm -nonfilterable aggregates were evidenced [27]. Once dispersed by pronase treatment and transferred to favorable growth conditions these small cells turned out to be of spherical shape and viable, although poorly [27]. They were named at that time “elementary bodies”. Our EV isolation process involved a 0.22 μm filtration step and a viability control ensuring the depletion of such elementary bodies which suggests that the 3% largest structure in our EV preparation are really large EV and not elementary bodies resulting from aberrant cell divisions in unfavorable growth conditions.

Universality of EV production by *Mycoplasma* spp.

Our validated protocol was used to test the capacity of 5 other *Mycoplasma* (sub)species, belonging to two different phylogenetic groups, to produce EV (Table 1). To take into consideration the different loss of titer between fast growing, acidifying species (*M. mycoides* subsp. *capri* and *M. capricolum* subsp. *capricolum*) and others, EV were isolated from all species from supernatants obtained after either 48h or 96h (see Table 1). Fig 2 shows the spherical shape of EV isolated from different mycoplasma (sub)species. The mean respective diameters varied both between species and within species, as illustrated for *M. agalactiae* (Fig 3). The smallest vesicles were observed for *M. agalactiae* strain L14628 and *M. bovis* strain L15762. *M. mycoides* subsp. *mycoides* Afadé produced the largest EV. Similarly, the EV production yield, estimated by counting the mean number of EV per microscopic field varied considerably between species, *M. fermentans* strain PG18^T and *M. mycoides* subsp. *mycoides* strain Afadé being the most productive under our experimental conditions (Table 1). Four out of seven EV preparations contained small amounts of viable cells (Table 1). This precluded any characterization of

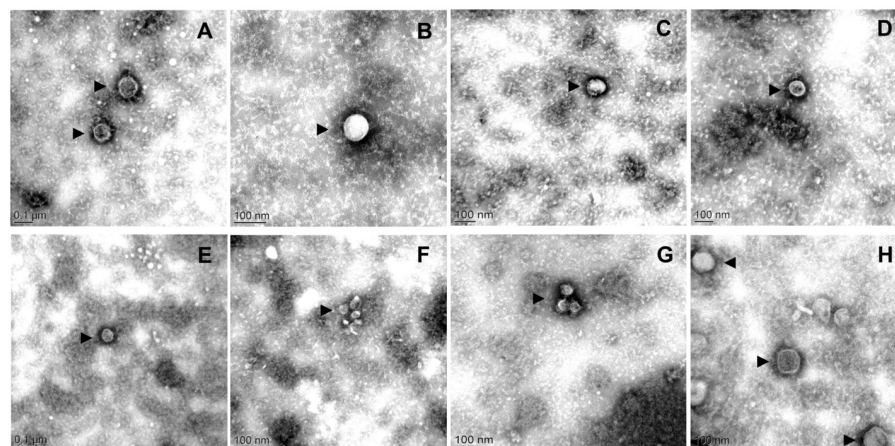


Fig 2. Electron micrographs of negatively-stained EV purified from *A. laidlawii* PG8^T (A), *M. mycoides* subsp. *mycoides* Afadé (B), *M. mycoides* subsp. *capri* PG3^T (C), *M. capricolum* subsp. *capricolum* L15937 (D), *M. agalactiae* 5632 (E), *M. agalactiae* L14628 (F), *M. bovis* L15762 (G) and *M. fermentans* PG18^T (H). Examples of EV are indicated by black arrowheads.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208160.g002>

DNA/RNA content based on PCR techniques and further emphasized the difficulty of separating EV from minute sized cells characteristic of the *Mycoplasma* genus.

Our m-PPLO medium inoculated with a high density of cells became suboptimal after 24h and viability started to decrease (loss of 1 to 3 log, Table 1). This raises the question of whether the observed EV might result from spontaneously reassembling membrane fragments of dead cells, *i.e.* could result from a degenerative process instead of being actively produced by viable cells. Two elements are in favor of an active EV production by viable cells. Firstly, the level of EV production is not related to cellular mortality in m-PPLO overtime but instead depends on species and strains: for instance, *M. fermentans* and *M. bovis* showed similar viable cell counts at 24h and 96h in m-PPLO although *M. fermentans* produced much more EV than *M. bovis*. Secondly, proteolipid vesicles artificially reconstituted from *M. fermentans* membranes were described as 1 μ m-spheres [28], which is far larger than the EV observed here. This point was experimentally addressed by studying the EV production by heat- or gentamicin-killed *Mmm* strain Afadé cells. *Mmm* viability could be dramatically reduced by a 1h incubation at 60°C [29] or by treatment with 200 μ g/ml gentamicin (*i.e.* 4-fold the MIC [30]). Indeed no viable cells were detected after heat treatment and a loss of 5 log was observed after 72h incubation with 200 μ g/ml of gentamicin. EV production was quantified by immunodetection of the *Mmm* glucose permease (MSC_0860), a protein present in the membrane of *Mmm* EV (S1 Table) and specifically detected with high sensitivity by the 3f3 monoclonal antibody [19]. A correlation was indeed established between EV density estimated on electron micrographs and by the 3f3 detection by dot blotting (S2A Fig). Both heat and gentamicin treatment greatly reduced EV production (S2B Fig). This demonstrates that EV production relies on the presence of viable cells. Fig 4 further shows some putative vesicles budding from the cell surface of *Mmm* Afadé cells grown for 24h in m-PPLO medium. The size ratio between the cell and the vesicle is not characteristic of a binary fission and hence precludes the hypothesis of aberrant cell division.

Whatever the exact mechanism leading to EV release, it results in a multiplication of mycoplasma “forms/particles” that interact with the host cells. The protein content of EV-membranes was further analyzed to investigate its potential role in mycoplasma-host interactions.

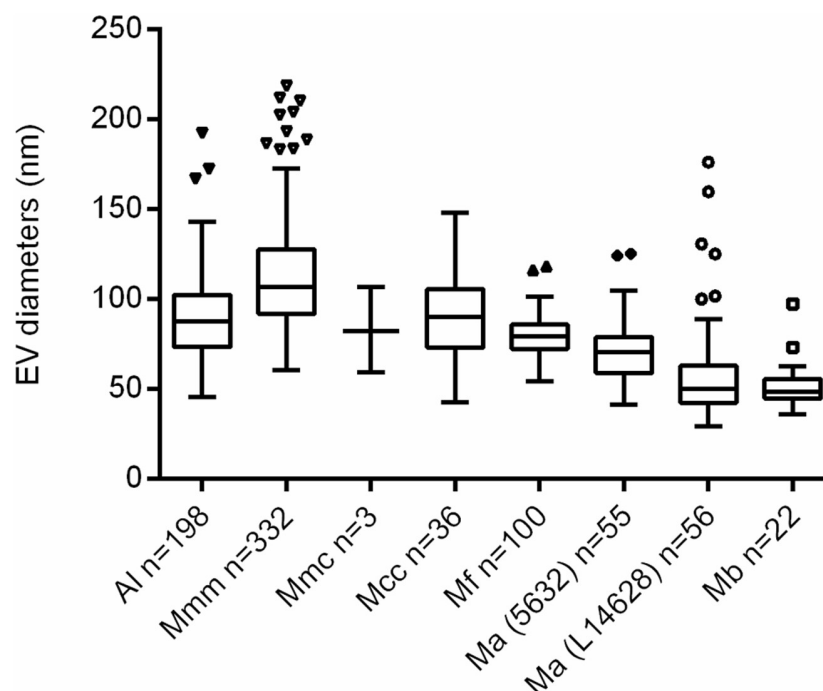


Fig 3. EV diameters from different (sub)species, as observed in electron micrographs (Tukey representation). Al, *A. laidlawii* PG8^T; Mmm, *M. mycoides* subsp. *mycoides* Afadé; Mmc, *M. mycoides* subsp. *capri* PG3^T; Mcc, *M. capricolum* subsp. *capricolum* L15937; Ma, *M. agalactiae*; Mb, *M. bovis* L15762; and Mf, *M. fermentans* PG18^T. The number (n) of EV observed is indicated for each (sub)species. For Mmm, this “n” results from 3 batches of EV production.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208160.g003>

Identification of virulence factors among the EV membrane associated proteins

The three EV preparations from *Mycoplasma* (sub)species showing none or negligible viable cell contamination (Table 1), i.e. *M. mycoides* subsp. *mycoides* Afadé, *M. agalactiae* 5632 and *M. fermentans* PG18^T, were chosen to perform proteomic analyses on Triton X-114 enriched

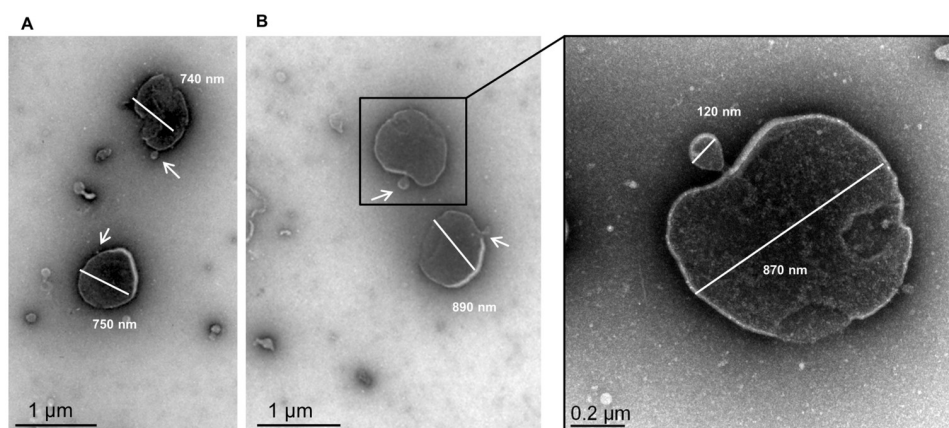


Fig 4. Transmission electron micrographs (A, B) of *M. mycoides* subsp. *mycoides* (strain Afadé) cells showing vesicle-like structures budding from the surface of the mycoplasma cells. A zoom of micrograph B is shown in the right panel. Diameters were estimated using imageJ.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208160.g004>

fractions. In these fractions 88, 58 and 258 proteins were identified, respectively, of which 54%, 88% and 54% were membrane-bound or membrane proteins (S1 Table). However, in our hands, the protein concentration in each Triton extract was not equivalent for the 3 species and hence the relative abundance of each protein was hardly comparable between species (S1 Table). A semi-quantitative scale of the PAI was established to compare which proteins were most abundant in each preparation ($\text{PAI} \geq 1.0 = ++++$; $0.5-1.0 [= +++]$; $0.1-0.5 [= ++]$ and a spectral count $<0.1 = +$ (S1 Table)).

In order to demonstrate that the produced vesicles could play a role in the pathogenesis process, we highlighted all EV-membrane associated proteins which could be involved in the mycoplasma-host interactions (Table 2).

Lipoproteins, which are known to be potent stimulators of macrophage activity associated with pro-inflammatory cytokines release [31], represented a non-negligible fraction of EV-proteins, ranging from 10 to 38%. As EV are able to disseminate a long distance from the infection site [32], the presence of lipoproteins in EV could contribute to the inflammatory process associated with mycoplasmoses. We further attempted to identify the EV-associated lipoproteins within each species that could play a role in interaction with the host (immune modulation, host colonization, interaction with host extracellular matrix. . .) (Table 2). A few of these lipoproteins were present in EV membrane fractions of all 3 species, including the p37 lipoprotein, which was shown to be oncogenic in *M. fermentans* [33]. Its action might be augmented as a result of dissemination through EV. Similarly the OppA lipoprotein that can induce apoptosis [34] is found in abundant proportions in both *M. agalactiae* and *M. fermentans* EV. Several other lipoproteins were identified, that are known to be major antigens of the different species, such as LppB and homologues [35]. These lipoproteins also exhibit several immunomodulatory properties, e.g. the production of IFN γ by *Mmm* LppA [36]. Variable surface proteins of *M. agalactiae* (Vpmas), which are involved in high frequency phase variation and hence immune escape, were also recovered from EV [37]. These Vpmas have recently been characterized as major adhesins [38]. *M. agalactiae* EV also carry a lipoprotein nuclease MAG5040 which has been proposed to allow neutrophil extracellular trap escape [39]. Hence several mycoplasma lipoproteins found in EV have functions related to modulation of the host immune response and to host colonization.

A similar pattern was detected for other membrane-bound proteins that are not lipoproteins. This was the case of the Elongation factor Thermo unstable (Ef-Tu) which was one of the most abundant proteins in each EV preparation. Interestingly, Ef-Tu was also found to be one of the most abundant proteins in *Staphylococcus aureus* EV [6]. This moonlighting protein was shown to interact with components of the host extracellular matrix [40, 41]. Its presence in each of the 3 batches of EV could argue in favor of EV release being a non-stochastic process although it could also reflect the fact that Ef-Tu is one of the most abundant bacterial proteins [41]. Similarly, the chaperone Hsp70 (DnaK) was found in the 3 EV-proteomes and was one of the most abundant proteins in *Mmm* strain Afadé and *M. fermentans* PG18^T EV, based on spectral counts (Table 2 and S1 Table). Together with Ef-Tu, Hsp70 has been associated with antibody production, and cytokine secretion in *M. ovipneumoniae* [42]. Finally, *Mmm* Afadé and *M. fermentans* PG18^T EV contained several enzymes of general metabolism such as lactate dehydrogenase, pyruvate dehydrogenase E1 enzyme, glyceraldehyde dehydrogenase, pyruvate kinase, phosphoglycerate kinase and transketolase, also known to interact with components of the host extracellular matrix [40]. The EV produced by *Mmm* Afadé were also enriched in the glucose permease MSC_0860, which had a practical interest as it was used as a marker for EV semi-quantification (see here before).

Mycoplasma proteins transported by vesicular structures had already been observed by electron microscopy as early as 1964 [43]. The authors described globular elements measuring

Table 2. List of EV membrane proteins potentially involved in mycoplasma-host interactions.

	Proteins	<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> strain Afadé		<i>M. agalactiae</i> strain 5632		<i>M. fermentans</i> strain PG18 ^T		Putative roles
		Uniprot n°	PAI	Uniprot n°	PAI	Uniprot n°	PAI	
Lipoproteins	Lipoprotein p37	A0A0F2BJ67	+++	A5IY58	++	C4XFE4	+++ +	Oncogenic
	Lipoprotein LppB and homologues	A0A126SRI9	+++ +	A5IZ93	+++	-	-	Major antigen
				A5IY11	++			
				A5IY23	++			
	Lipoprotein p48 / MALP-404	-	-	F5HGV8	+++ +	Q9RGX5	+++ +	Immune modulation
	Lipoprotein p80 and homologues	-	-	A5IYU2	+++ +	C4XER1	+++ +	Major antigen
	Oligopeptide ABC transporter oppA	Nd	Nd	A5IXN9	+++	C4XEL2	+++ +	Apoptotic
	Lipoprotein nuclease MAG5040	-	-	A5IYU3	++	C4XER2	+++ +	Major antigen, Host colonization
	Lipoprotein acid phosphatase	-	-	A5IYN5	+++	C4XF87	++	Host colonization
	Lipoprotein p29	-	-	-	-	Q49159	+++ +	Major antigen, adhesion
	Variable surface lipoprotein Y (VpmaY)	-	-	F5HDB1	+++	-	-	Major antigen, interaction with host extracellular matrix
	Variable surface lipoprotein A (vpmaX)	-	-	F5HIG3	++	-	-	Major antigen, interaction with host extracellular matrix
	Variable surface lipoprotein U (VpmaU)	-	-	F5HEE7	++	-	-	Major antigen, interaction with host extracellular matrix
	Predicted lipoprotein MAG1050	-	-	A5IXP4	++	-	-	Host colonization
	Lipoprotein p40	-	-	F5HEF4	++	-	-	Interaction with host extracellular matrix
Non-lipoproteins	Lipoprotein LppA p72	A0A109WHL4	++	-	-	-	-	Major antigen, immune modulation
	Elongation factor TU	A0A0F2BJ16	+++ +	A5IYA9	+++ +	C4XEI5	+++ +	Interaction with host extracellular matrix, immune modulation
	Chaperone protein DnaK (Hsp70)	A0A0F2BNC8	+++ +	A5IXT5	+	C4XE63	+++ +	Immune modulation
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	A0A126SR57	+++	Nd	Nd	C4XF61	+++ +	Interaction with host extracellular matrix
	Pyruvate kinase	A0A0X8KSH0	+++	Nd	Nd	C4XEC6	+++ +	Interaction with host extracellular matrix
	Lactate dehydrogenase	A0A0F2BK13	+++	Nd	Nd	C4XEL0	+++	Interaction with host extracellular matrix
	Phosphoglycerate mutase	A0A126SQS4	++	Nd	Nd	C4XEM3	+++ +	Interaction with host extracellular matrix
	Transketolase	A0A0F2BGX7	+	Nd	Nd	C4XFT7	++	Interaction with host extracellular matrix
	PTS glucose permease ptsG	A0A0X8KVY6	+++ +	-	-	-	-	Major antigen, immune-modulation
	Pyruvate dehydrogenase E1 subunit α	A0A0F2BLA7	+++	-	-	Nd	Nd	Interaction with host extracellular matrix
	Pyruvate dehydrogenase E1 subunit β	A0A0F2BL90	++	-	-	Nd	Nd	Interaction with host extracellular matrix
	Hexose phosphate transport protein uhpT	Nd	Nd	A5IYT6	++	-	-	Host colonization

Uniprot n°: uniprot accession number. PAI: protein abundance index (++++: ≥1.0; +++: [0.5–1.0]; ++: [0.1–0.5]; +: <0.1). Nd, proteins not detected in the proteome; “-”, no homologous proteins were found in this (sub)species. Proteins retrieved in EV from the three species are in bold.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208160.t002>

10 to 100 nm and carrying the then called “not-cell bound antigens”. Our analysis of EV membrane proteins confirmed that EV could be such carrier of antigens and could correspond to the globular structures described by Eng and Froholm [43]. Further identification of the complete cargo (soluble proteins including other antigens and DNA/RNA) has yet to be achieved but will require further improvement of the EV purification process, with a 100% efficient elimination of cell contaminations and protein aggregates. The use of gradient-based purification method might be a promising way [44].

Conclusions

Fifty years ago microscopic observations led to the conclusion that mycoplasma replicating cells had a minimal diameter of 300 nm. Vesicular structures such as “globular elements” (10–100 nm) and “elementary bodies” (100–250 nm) were also observed, the latter being considered the results of aberrant cell division or reassembling of membrane fragments. The concept of extracellular vesicles actively secreted by bacteria was just starting to emerge at that time and mainly for Gram negative. Here, we showed that EV can be released by several *Mycoplasma* species, from different phylogenetic clades, and are produced by living cells in a budding-way compatible with the canonical definition of bacterial EV. The sizes of mycoplasma EV vary considerably (from 30 to 220 nm) and setting a size cut-off between small viable cells and vesicles is difficult. Nonetheless the vesicles purified in this study are different from the elementary bodies described by Robertson as the latter are removed by 0.22 μm filtration [27]. The recurring presence of homologous proteins in EV-membranes preparations from 3 *Mycoplasma* species, further contributes to characterize EV release as an active process that could constitute a new “secretion” pathway and hence account for some of the proteins recovered in mycoplasma secretomes. For instance, the secretome from *M. hyopneumoniae* has several proteins in common with the EV-proteome described here [45]. Although it has to be formally demonstrated in the host context, the release of EV could considerably multiply mycoplasma interaction with the host cells. Mycoplasma EV as a potential component of the interactome will require further attention for a better understanding of mycoplasma pathogenicity and also for vaccine development.

Supporting information

S1 Fig. Comparison of size distribution of EV (n = 322, three production batches) purified from *M. mycoides* subsp. *mycoides* Afadé (black bars) and cells (n = 124) from a stationary phase culture of *M. mycoides* subsp. *mycoides* Afadé (white bars). EV and cells were observed by TEM after negative staining and diameter was estimated using ImageJ. (TIF)

S2 Fig. A. Validation of 3f3 dot blotting for EV semi-quantification. EV were extracted from 6h, 48h and 96h cultures of *M. mycoides* subsp. *mycoides* strain Afadé in m-PPLO medium. Three production batches were done for each time point. EV are indicated by black arrowheads on electron micrographs. Their density was estimated by counting the number of EV per 5 μm^2 fields (scale: +/-, counts <1 EV/ 5 μm^2 ; +, 1–10 EV/ 5 μm^2 ; ++, 10–100 EV/ 5 μm^2). Dot blotting with 3f3 was performed on 2 μl EV extract for each time point and each batch. The intensity of dot blotting correlates with the EV density in electron micrographs. **B. Requirement of *Mycoplasma* viable cells for EV production.** *M. mycoides* subsp. *mycoides* strain Afadé cultivated in m-PPLO medium (10^8 – 10^9 cfu/ml) was submitted to heat (1h at 60°C, no more viable cells) or chemical (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamicin, viability was reduced to 10^2 and 10^7 cfu/ml with or without gentamicin, respectively) inactivation before EV purification

(for details see the [Materials and methods](#) section). EV (indicated by black arrowheads) density was estimated by counting on electron micrographs and/or by 3f3 dot-blotting (see panel A). When mycoplasma cells were killed no EV were produced.
(TIF)

S1 Table. Proteins identified from the Triton X-114 fractions of EV. Proteins are classified according to their PAI.
(DOCX)

Acknowledgments

We thank Lucie Geay (UCBL, Lyon, France) for preparation of samples for TEM and Sandrine Magnard (IBCP, Lyon, France) for access to ultracentrifugation facilities. The authors declare no conflict of interest. S.G.'s PhD research is jointly funded by the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety (Anses) and the French Agricultural Research Centre for International Development (CIRAD).

Author Contributions

Conceptualization: Patrice Gaurivaud, Florence Tardy.

Data curation: Patrice Gaurivaud, Florence Tardy.

Formal analysis: Patrice Gaurivaud.

Funding acquisition: Florence Tardy.

Investigation: Patrice Gaurivaud, Sarah Ganter, Alexandre Villard, Didier Chevret, Christelle Boulé.

Methodology: Patrice Gaurivaud, Sarah Ganter, Alexandre Villard.

Project administration: Florence Tardy.

Resources: Florence Tardy.

Supervision: Patrice Gaurivaud, Florence Tardy.

Validation: Patrice Gaurivaud, Florence Tardy.

Visualization: Patrice Gaurivaud.

Writing – original draft: Patrice Gaurivaud, Christelle Boulé, Véronique Monnet, Florence Tardy.

Writing – review & editing: Patrice Gaurivaud, Sarah Ganter, Alexandre Villard, Lucia Manso-Silvan, Didier Chevret, Christelle Boulé, Véronique Monnet, Florence Tardy.

References

1. Deatherage BL, Cookson BT. Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infect Immun*. 2012; 80(6):1948–1957. <https://doi.org/10.1128/IAI.06014-11> PMID: 22409932.
2. Bladen HA, Waters JF. Electron Microscopic Study of Some Strains of *Bacteroides*. *J Bacteriol*. 1963; 86:1339–1344. PMID: 14086111.
3. Kim JH, Lee J, Park J, Gho YS. Gram-negative and Gram-positive bacterial extracellular vesicles. *Semin Cell Dev Biol*. 2015; 40:97–104. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.02.006> PMID: 25704309.
4. Jan AT. Outer Membrane Vesicles (OMVs) of Gram-negative Bacteria: A Perspective Update. *Front Microbiol*. 2017; 8:1053. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01053> PMID: 28649237.

5. Dorward DW, Garon CF. DNA Is Packaged within Membrane-Derived Vesicles of Gram-Negative but Not Gram-Positive Bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1990; 56(6):1960–1962. PMID: [16348232](#).
6. Lee EY, Choi DY, Kim DK, Kim JW, Park JO, Kim S, et al. Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: proteomics-based characterization of *Staphylococcus aureus*-derived membrane vesicles. *Proteomics.* 2009; 9(24):5425–5436. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900338> PMID: [19834908](#).
7. Jiang Y, Kong Q, Roland KL, Curtiss R 3rd. Membrane vesicles of *Clostridium perfringens* type A strains induce innate and adaptive immunity. *Int J Med Microbiol.* 2014; 304(3–4):431–443. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.02.006> PMID: [24631214](#).
8. Lee JH, Choi CW, Lee T, Kim SI, Lee JC, Shin JH. Transcription factor sigmaB plays an important role in the production of extracellular membrane-derived vesicles in *Listeria monocytogenes*. *PLoS One.* 2013; 8(8):e73196. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073196> PMID: [23977379](#).
9. Olaya-Abril A, Prados-Rosales R, McConnell MJ, Martin-Pena R, Gonzalez-Reyes JA, Jimenez-Mun-guia I, et al. Characterization of protective extracellular membrane-derived vesicles produced by *Streptococcus pneumoniae*. *J Proteomics.* 2014; 106:46–60. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.04.023> PMID: [24769240](#).
10. Rivera J, Cordero RJ, Nakouzi AS, Frases S, Nicola A, Casadevall A. *Bacillus anthracis* produces mem-brane-derived vesicles containing biologically active toxins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107(44):19002–19007. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008843107> PMID: [20956325](#).
11. Schrempf H, Koebsch I, Walter S, Engelhardt H, Meschke H. Extracellular *Streptomyces* vesicles: amphorae for survival and defence. *Microb Biotechnol.* 2011; 4(2):286–299. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00251.x> PMID: [21342473](#).
12. Haurat MF, Elhenawy W, Feldman MF. Prokaryotic membrane vesicles: new insights on biogenesis and biological roles. *Biol Chem.* 2015; 396(2):95–109. <https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0183> PMID: [25178905](#).
13. Ciccarelli FD, Doerks T, von Mering C, Creevey CJ, Snel B, Bork P. Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. *Science.* 2006; 311(5765):1283–1287. <https://doi.org/10.1126/science.1123061> PMID: [16513982](#).
14. Chernov VM, Chernova OA, Mouzykantov AA, Efimova IR, Shaymardanova GF, Medvedeva ES, et al. Extracellular vesicles derived from *Acholeplasma laidlawii* PG8. *ScientificWorldJournal.* 2011; 11:1120–1130. <https://doi.org/10.1100/tsw.2011.109> PMID: [21623458](#).
15. Maniloff J, Morowitz HJ. Cell biology of the mycoplasmas. *Bacteriol Rev.* 1972; 36(3):263–290. PMID: [4345848](#).
16. Chernov VM, Mouzykantov AA, Baranova NB, Medvedeva ES, Grygorieva TY, Trushin MV, et al. Extra-cellular membrane vesicles secreted by mycoplasma *Acholeplasma laidlawii* PG8 are enriched in viru-lence proteins. *J Proteomics.* 2014; 110:117–128. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.07.020> PMID: [25088052](#).
17. Bertin C, Pau-Roblot C, Courtois J, Manso-Silvan L, Thiaucourt F, Tardy F, et al. Characterization of free exopolysaccharides secreted by *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. *PLoS One.* 2013; 8(7):e68373. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068373> PMID: [23869216](#).
18. Winner F, Rosengarten R, Citti C. In vitro cell invasion of *Mycoplasma gallisepticum*. *Infect Immun.* 2000; 68(7):4238–4244. PMID: [10858241](#).
19. Gaurivaud P, Persson A, Grand DL, Westberg J, Solsona M, Johansson KE, et al. Variability of a glu-cose phosphotransferase system permease in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony. *Microbiology.* 2004; 150(Pt 12):4009–4022. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27247-0> PMID: [15583154](#).
20. Collins TJ. ImageJ for microscopy. *Biotechniques.* 2007; 43(1 Suppl):25–30. <https://doi.org/10.2144/000112517> PMID: [17936939](#).
21. Taguchi Y, Schatzl HM. Small-scale Triton X-114 Extraction of Hydrophobic Proteins. *Bio Protoc.* 2014; 4(11). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1139> PMID: [29170741](#).
22. Langella O, Valot B, Balliau T, Blein-Nicolas M, Bonhomme L, Zivy M. X!TandemPipeline: A Tool to Manage Sequence Redundancy for Protein Inference and Phosphosite Identification. *J Proteome Res.* 2017; 16(2):494–503. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00632> PMID: [27990826](#).
23. Ishihama Y, Oda Y, Tabata T, Sato T, Nagasu T, Rappsilber J, et al. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol Cell Proteomics.* 2005; 4(9):1265–1272. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500061-MCP200> PMID: [15958392](#).
24. Moller S, Croning MD, Apweiler R. Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics.* 2001; 17(7):646–653. PMID: [11448883](#).
25. Folmsbee M, Noah C, McAlister M. Nutritional Effects on the Growth, Cell Size, and Resistance to Stress of *Acholeplasma laidlawii*. *PDA J Pharm Sci Technol.* 2010; 64(6):581–592. PMID: [21502068](#).

26. Domermuth CH, Nielsen MH, Freundt EA, Birch-Andersen A. Ultrastructure of Mycoplasma Species. J Bacteriol. 1964; 88:727–744. PMID: [14208513](#).
27. Robertson J, Gomersall M, Gill P. *Mycoplasma hominis*: growth, reproduction, and isolation of small viable cells. J Bacteriol. 1975; 124(2):1007–1018. PMID: [1102522](#).
28. Rechnitzer H, Rottem S. Reconstituted proteolipid vesicles prepared from *Mycoplasma fermentans* membranes are able to bind and fuse with Molt-3 cells. Curr Microbiol. 2006; 53(4):293–297. <https://doi.org/10.1007/s00284-006-0007-8> PMID: [16941241](#).
29. Mwirigi M, Nkando I, Aye R, Soi R, Ochanda H, Berberov E, et al. Experimental evaluation of inactivated and live attenuated vaccines against *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. Vet Immunol Immunopathol. 2016; 169:63–67. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.12.006> PMID: [26827840](#).
30. Ayling RD, Bisgaard-Frantzen S, March JB, Godinho K, Nicholas RA. Assessing the in vitro effectiveness of antimicrobials against *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small-colony type to reduce contagious bovine pleuropneumonia infection. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49(12):5162–5165. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.12.5162-5165.2005> PMID: [16304194](#).
31. Browning GF, Noormohammadi AH, Markham PF. Identification and Characterization of Virulence Genes in Mycoplasmas. In: Browning GF, Citti C, editors. Mollicutes: molecular biology and pathogenesis: Caister Academic Press 2014. p. 77–90.
32. Kuehn MJ, Kesty NC. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. Genes Dev. 2005; 19(22):2645–2655. <https://doi.org/10.1101/gad.1299905> PMID: [16291643](#).
33. Liu D, Hu Y, Guo Y, Zhu Z, Lu B, Wang X, et al. Mycoplasma-associated multidrug resistance of hepatocarcinoma cells requires the interaction of P37 and Annexin A2. PLoS One. 2017; 12(10):e0184578. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184578> PMID: [28976984](#).
34. Hopfe M, Henrich B. OppA, the ecto-ATPase of *Mycoplasma hominis* induces ATP release and cell death in HeLa cells. BMC Microbiol. 2008; 8:55. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-55> PMID: [18394151](#).
35. Miliadoudou DR, Mather A, Vilei EM, Du Plessis DH. Identification of genes coding for B cell antigens of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony (MmmSC) by using phage display. BMC Microbiol. 2009; 9:215. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-215> PMID: [19818124](#).
36. Totte P, Mather A, Reslan L, Boublik Y, Niang M, Du Plessis D, et al. Identification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony genes coding for T-cell antigens. Clin Vaccine Immunol. 2010; 17(8):1211–1216. <https://doi.org/10.1128/CI.00132-10> PMID: [20534794](#).
37. Citti C, Nouvel LX, Baranowski E. Phase and antigenic variation in mycoplasmas. Future Microbiol. 2010; 5(7):1073–1085. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.71> PMID: [20632806](#).
38. Hegde S, Zimmermann M, Rosengarten R, Chopra-Dewasthaly R. Novel role of Vpmas as major adhesins of *Mycoplasma agalactiae* mediating differential cell adhesion and invasion of Vpma expression variants. Int J Med Microbiol. 2018; 308(2):263–270. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.11.010> PMID: [29229193](#).
39. Cacciottolo C, Cubeddu T, Addis MF, Anfossi AG, Tedde V, Tore G, et al. Mycoplasma lipoproteins are major determinants of neutrophil extracellular trap formation. Cell Microbiol. 2016; 18(12):1751–1762. <https://doi.org/10.1111/cmi.12613> PMID: [27166588](#).
40. Grundel A, Jacobs E, Dumke R. Interactions of surface-displayed glycolytic enzymes of *Mycoplasma pneumoniae* with components of the human extracellular matrix. Int J Med Microbiol. 2016; 306(8):675–685. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.09.001> PMID: [27616280](#).
41. Widjaja M, Harvey KL, Hagemann L, Berry IJ, Jarocki VM, Raymond BBA, et al. Elongation factor Tu is a multifunctional and processed moonlighting protein. Sci Rep. 2017; 7(1):11227. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10644-z> PMID: [28894125](#).
42. Jiang F, He J, Navarro-Alvarez N, Xu J, Li X, Li P, et al. Elongation Factor Tu and Heat Shock Protein 70 Are Membrane-Associated Proteins from *Mycoplasma ovipneumoniae* Capable of Inducing Strong Immune Response in Mice. PLoS One. 2016; 11(8):e0161170. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161170> PMID: [27537186](#).
43. Eng J, Froholm O. Immune electron microscopy of not cell-bound antigen of *Mycoplasma pneumoniae*. Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol. 1971; 79(6):759–763. PMID: [5290405](#).
44. Dauros Singorenko P, Chang V, Whitcombe A, Simonov D, Hong J, Phillips A, et al. Isolation of membrane vesicles from prokaryotes: a technical and biological comparison reveals heterogeneity. J Extracell Vesicles. 2017; 6(1):1324731. <https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1324731> PMID: [28717421](#).
45. Paes JA, Lorenzatto KR, de Moraes SN, Moura H, Barr JR, Ferreira HB. Secretomes of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* reveal differences associated to pathogenesis. J Proteomics. 2017; 154:69–77. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.12.002> PMID: [28003119](#).

Table S1. Proteins identified from the Triton X-114 fractions of EV. Proteins are classified according to their PAI.

***M. agalactiae* 5632 (Triton X-114 fraction)**

Uniprot accession number	Molligen accession number	predicted function	log(E value)	Coverage	MW	size	Spectra	Specific	Uniques	Specific uniques	Uniques peptide-mod-charge	Theoretical number of tryptic peptides	PAI	
F5HGV8	MAG0120	predicted lipoprotein P48	-182,42	40	51	465	53		24		31	22	2,41	++++
A5IZ32	MAG5910	bifunctional metallophosphatase/5'-nucleotidase (1 TMD)	-183,94	45	76	681	47		36		42	26	1,81	++++
A5IYA9	MAG3200	elongation factor TU	-90,47	30	43	396	25		14		15	20	1,25	++++
A5IYU2	MAG5030	lipoprotein P80	-147,48	30	81	721	41		24		29	37	1,11	++++
A5IXY4	MAG1950	30S ribosomal protein S20 rpsT	-4,64	23	10	89	2		2		2	2	1,00	++++
A5IYE9	MAG3600	hypothetical membrane protein (1 TMD)	-41,19	36	22	194	10		9		9	11	0,91	+++
A5IYN5	MAG4460	lipoprotein acid phosphatase	-55,13	17	52	462	14		11		12	16	0,88	+++
A5IYR3	MAG4740	Hypothetical protein, predicted lipoprotein	-27,05	22	25	222	7		6		6	8	0,88	+++
A5IYE7	MAG3580	hypothetical membrane protein (7 TMD)	-21,66	14	35	304	5		4		4	6	0,83	+++
A5IXR1	MAG1220	hypothetical membrane protein (1 TMD), lemA family protein	-56,76	38	26	232	12		11		12	15	0,80	+++
A5IXQ7	MAG1180	XAA-PRO aminopeptidase	-29,50	16	40	350	8		5		6	10	0,80	+++
A5IXN9	MAG1000	oligopeptide ABC transporter oppA (lipoprotein)	-151,54	27	110	959	32		27		29	42	0,76	+++
A5IXN8	MAG0990	hypothetical membrane protein (5 TMD)	-22,36	14	35	299	7		5		6	10	0,70	+++
A5IZ93	MAG6520	Lipoprotein LppB homolog	-109,67	26	70	621	21		16		19	32	0,66	+++
F5HDB1	MAG7080	Variable surface lipoprotein Y (VpmaY)	-41,43	17	37	346	9	8	7	6	7	14	0,64	+++
A5IXJ8	MAG0590	hypothetical membrane protein (5 TMD) OxaA/YidC family	-114,19	31	83	715	21		20		20	33	0,64	+++
A5IZ61	MAG6200	predicted lipoprotein (leucine-rich repeat protein)	-16,09	12	27	241	6		5		6	10	0,60	+++
A5IXF3	MAG0150	Sugar ABC transporter Permease	-42,63	12	74	662	12		11		11	21	0,57	+++
A5IY98	MAG3090	hypothetical membrane protein (1 TMD)	-37,31	20	36	314	8		7		8	15	0,53	+++
A5IYU3	MAG5040	lipoprotein nuclease MAG5040	-39,18	21	45	390	9		8		9	19	0,47	++
A5IY11	MAG2220	lipoprotein LppB homolog	-34,96	17	69	617	11	10	10	9	11	24	0,46	++
F5HIG3	MAG7070	Variable surface lipoprotein A (vpmaX)	-13,74	13	25	221	4	3	3	2	4	9	0,44	++
A5IXE9	MAG0110	hypothetical membrane protein (7 TMD)	-12,30	14	31	273	3		3		3	7	0,43	++
A5IYV6	MAG5170	Energy-coupling factor transporter ATP-binding protein EcfA2	-17,62	7	35	311	5		5		5	12	0,42	++
A5IYT6	MAG4970	hexosephosphate transport protein uhpT (12 TMD)	-13,04	4	54	498	3		3		3	8	0,38	++
A5IZE4	MAG7030	ECF transporter S component (7 TMD, DUF1393)	-8,39	8	38	335	4		3		3	11	0,36	++
A5IY24	MAG2350	predicted lipoprotein	-17,86	10	40	356	4		3		4	12	0,33	++
A5IXX0	MAG1810	hypothetical membrane protein (4 TMD)	-30,07	14	53	472	6		5		5	18	0,33	++
A5IXG6	MAG0280	hypothetical membrane protein (6 TMD)	-27,42	9	75	655	8		7		8	26	0,31	++
A5IZG3	MAG7220	1-acyl-SN-glycerol-3-phosphate acyltransferase PlsC	-16,02	15	28	246	4		4		4	13	0,31	++
A5IY57	MAG2680	hypothetical membrane protein (1 TMD)	-20,12	14	56	490	6		6		6	20	0,30	++

A5IY70	MAG2810	hypothetical membrane protein (2 TMD)	-15,06	9	48	416	5		5		5	17	0,29	++
A5IY63	MAG2740	Alcohol dehydrogenase	-21,18	12	37	348	4		4		4	14	0,29	++
F5HEE7	MAG7090	Variable surface lipoprotein U (VpmaU)	-12,37	5	25	238	3		2		3	11	0,27	++
A5IY50	MAG2610	lipoprotein, peptidase family S41	-44,03	10	71	625	7		6		7	26	0,27	++
A5IY23	MAG2340	lipoprotein LppB homolog	-34,54	14	66	586	7	6	7	6	7	27	0,26	++
A5IXP4	MAG1050	predicted lipoprotein	-17,66	13	37	328	4		4		4	16	0,25	++
A5IZ59	MAG6180	50S ribosomal protein L7/L12 rplL	-6,84	18	13	123	2		2		2	8	0,25	++
A5IYU7	MAG5080	predicted lipoprotein	-30,68	14	59	510	6		6		6	25	0,24	++
A5IYG9	MAG3800	hypothetical membrane protein (1 TMD)	-5,45	8	26	228	3		3		3	13	0,23	++
A5IXT4	MAG1450	predicted lipoprotein	-5,43	8	35	317	4		3		4	18	0,22	++
A5IXR0	MAG1210	hypothetical membrane protein (2 TMD)	-10,66	6	70	606	5		4		5	23	0,22	++
A5IXW7	MAG1780	hypothetical membrane protein (2 TMD)	-7,44	6	38	331	3		2		2	14	0,21	++
A5IXT2	MAG1430	hypothetical membrane protein (1 TMD)	-16,60	8	56	495	4		4		4	19	0,21	++
A5IY81	MAG2920	hypothetical membrane protein (2 TMD)	-30,31	9	83	748	6		6		6	29	0,21	++
A5IYY3	MAG5430	50S ribosomal protein L2 rplB	-4,14	6	31	281	2		2		2	10	0,20	++
A5IY58	MAG2690	lipoprotein p37	-17,95	7	50	438	4		4		4	21	0,19	++
A5IYP2	MAG4530	hypothetical membrane protein (2 TMD)	-13,62	7	53	442	4		3		3	21	0,19	++
A5IYV7	MAG5180	ABC transporter ATP-binding protein	-8,04	7	29	265	2		2		2	12	0,17	++
F5HEF4	MAG2410	lipoprotein P40	-10,39	5	40	359	3		2		2	18	0,17	++
A5IYU6	MAG5070	ABC transporter permease protein (6 TMD)	-4,18	5	38	327	2		2		2	13	0,15	++
A5IZG9	MAG7280	Chaperone protein DnaJ	-3,24	9	41	376	2		2		2	14	0,14	++
A5IYV4	MAG5150	predicted lipoprotein MAG1050	-5,79	5	38	332	2		2		2	15	0,13	++
A5IYV5	MAG5160	ABC/ECF transporter, transmembrane component (5 TMD)	-8,33	6	35	301	2		2		2	16	0,13	++
A5IYV9	MAG5200	DNA-directed RNA polymerase alpha chain	-4,45	8	37	336	2		2		2	19	0,11	++
A5IXT5	MAG1460	Chaperone protein DnaK HSP70	-7,08	5	65	598	2		2		2	22	0,09	+
A5IXY7	MAG1980	predicted lipoprotein P60	-7,11	5	54	461	2		2		2	26	0,08	+
						107								
A5IYR7	MAG4780	putative ATP binding protein	-19,58	2	124	1	3		3		3	53	0,06	+

lipoproteins and transmembrane proteins

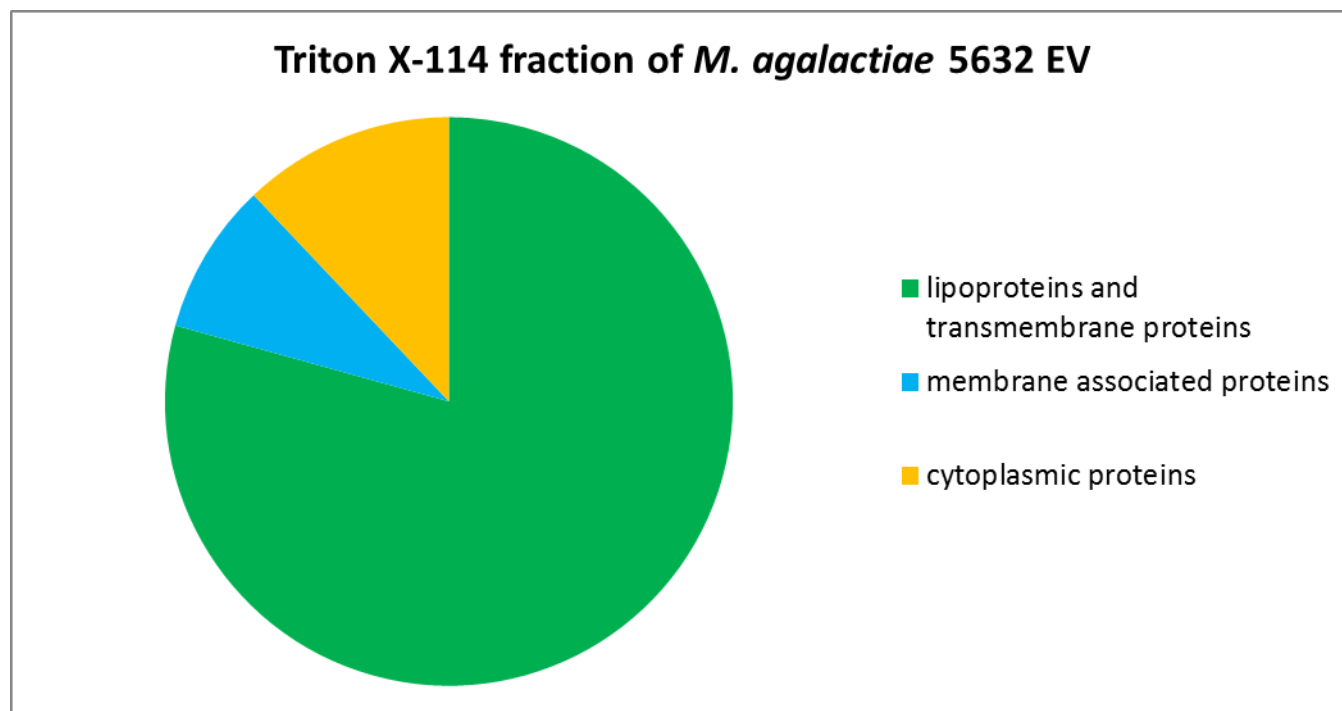
membrane associated proteins

cytoplasmic proteins

PAI semi quantitative scale: ++++: ≥ 1.0 ; +++: $[0.5-1.0]$; ++: $[0.1-0.5]$; + < 0.1 .

Proteins retrieved in EV from the three species are in bold

	membrane	membrane-bound	cytoplasmic
<i>M. agalactiae</i> 5632 EV	46,00	5	7
58 proteins			
percentage	79,31	9	12



M. mycoides subsp. *mycoides* Afadé (Triton X-114 fraction)

Uniprot accession number	molligen accession number	Predicted function	log (E value)	Coverage	MW	size	Spectra	Specif ic	Uniques	Specific uniques	Uniques peptide- mod- charge	Theoretical number of tryptic peptides	PAI
--------------------------------	---------------------------------	--------------------	------------------	----------	----	------	---------	--------------	---------	---------------------	---------------------------------------	---	-----

A0A126SRI9	MSC_0519	lipoprotein LppB	-717,20	76	70	622	158	106	135	30	5,27	++++
A0A0F2BPZ9	MSC_0079	ABC transporter phosphonate (lipoprotein)	-357,42	63	50	447	100	53	67	24	4,17	++++
A0A0F2BJ77	MSC_0957	predicted lipoprotein	-244,18	47	49	433	59	39	49	22	2,68	++++
A0A126SRQ1	MSC_0397	predicted lipoprotein	-46,87	37	26	237	13	9	12	6	2,17	++++
A0A0X8KVY6	MSC_0860	glucose permease PTS ptsG	-73,70	20	73	676	24	19	20	18	1,33	++++
A0A0F2BJ16	MSC_0160	Elongation factor TU	-81,83	42	43	395	20	17	19	20	1,00	++++
A0A0F2BNC8	MSC_0610	chaperone protein DnaK Hsp70	-109,86	27	64	591	21	17	18	21	1,00	++++
A0A0F2BLJ1	MSC_0257	glycerol uptake facilitator factor permease	-19,09	14	27	259	5	4	4	5	1,00	++++
A0A0F2BLA7	MSC_0265	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	-38,73	27	42	370	14	11	13	16	0,88	+++
A0A126SR57	MSC_0679	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-66,62	28	37	337	14	12	13	17	0,82	+++
A0A0F2BPV7	MSC_0588	Cell division protein FtsZ	-76,85	24	41	386	11	10	11	14	0,79	+++
A0A0F2BK13	MSC_0532	L-lactate dehydrogenase	-44,13	28	35	318	10	10	10	13	0,77	+++
A0A0F2BN33	MSC_0678	Phosphoglycerate kinase	-65,07	34	44	404	15	14	15	20	0,75	+++
A0A0F2BI99	MSC_0112	Acyl-phosphate:glycerol-3-phosphate O-acyltransferase PlsY (7 TMD)	-9,63	9	29	253	2	2	2	3	0,67	+++
A0A0F2BJ67	MSC_0790	Lipoprotein p37	-68,08	24	56	490	13	13	13	20	0,65	+++
A0A126SR61	MSC_0575	predicted lipoprotein	-63,56	37	39	339	12	12	12	19	0,63	+++
A0A126SRA1	MSC_0671	hypothetical membrane protein (7 TMD)	-21,31	10	36	314	5	5	5	8	0,63	+++
A0A120KUK9	MSC_0163	leucine aminopeptidase	-54,92	20	50	451	12	9	10	21	0,57	+++
A0A0F2BHF2	MSC_0607b/608	30S ribosomal protein S2	-16,95	15	33	292	5	5	5	9	0,56	+++
A0A126SQQ3	MSC_0728	30S ribosomal protein S5	-27,65	22	28	254	6	5	6	11	0,55	+++
A0A0F2BP06	MSC_0742	50S ribosomal protein L2	-11,41	14	31	282	4	4	4	8	0,50	+++
A0A0F2BI79	MSC_0278	30S ribosomal protein S4	-11,96	16	24	208	5	4	4	10	0,50	+++
A0A126SUD1	MSC_0334	histidyl-tRNA synthetase	-29,85	19	48	414	9	8	9	20	0,45	++
A0A0F2BHR4	MSC_0011	ribose/galactose ABC transporter	-51,70	17	61	550	11	11	11	25	0,44	++
A0A126SSH7	MSC_0258	glycerol kinase	-62,94	19	57	505	11	9	10	27	0,41	++
A0A0F2BGY7	MSC_0739	30S ribosomal protein S3	-17,90	14	26	233	4	4	4	10	0,40	++
A0A0F2BLE2	MSC_0263	NADH oxydase	-19,16	12	50	454	8	6	7	20	0,40	++
A0A0F2BNK0	MSC_0453	trigger factor (prolyl isomerase)	-47,37	22	49	428	10	9	10	26	0,38	++
A0A126SQY0	MSC_0757	transmembrane protein (3 TMD) tetraspanin family	-17,11	11	29	253	3	3	3	8	0,38	++
A0A0F2BL90	MSC_0266	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	-12,60	12	36	329	5	4	5	14	0,36	++
A0A0F2BNX6	MSC_0830	thymidine phosphorylase	-32,10	19	49	437	8	7	8	23	0,35	++
A0A0F2BQ61	MSC_0029	FMN-dependent NADH-azoreductase	-19,18	15	22	199	3	3	3	9	0,33	++
A0A0F2BPN1	MSC_0256	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase	-3,71	10	22	190	2	2	2	6	0,33	++
A0A0X8KSH0	MSC_0261	pyruvate kinase	-21,79	12	54	478	6	6	6	19	0,32	++
A0A126SSP3	MSC_0134	CTP synthase	-28,70	14	60	532	8	7	8	26	0,31	++
A0A0F2BG74	MSC_0995	50S ribosomal proteine L1	-10,84	15	25	226	3	3	3	10	0,30	++
A0A0F2BIG2	MSC_0030	ABC transporter ATP binding protein	-12,58	12	39	344	5	5	5	17	0,29	++
A0A0F2BJU1	MSC_0744	50S ribosomal protein L4	-10,16	7	23	208	2	2	2	7	0,29	++
A0A126SS55	MSC_0349	infB IF2	-38,50	13	69	620	8	8	8	28	0,29	++
A0A0F2BKN6	MSC_0005	hypothetical membrane protein (3 TMD)	-10,68	6	43	363	4	3	4	15	0,27	++

A0A0F2BJI4	MSC_0527	lipoate protein ligase A	-9,77	9	40	345	4	3	3	16	0,25	++
A0A0F2BIN6	MSC_0505	glycose 6 P isomerase	-29,13	10	48	427	4	4	4	17	0,24	++
A0A0F2BL88	MSC_0689	hypothetical protein degV family	-7,19	9	32	279	3	3	3	13	0,23	++
A0A140DZP8	MSC_0971/978	UDP glucose 4 epimerase	-19,43	13	29	251	3	3	3	13	0,23	++
A0A0F2BMQ2	MSC_0276	dihydroxyacetone kinase	-3,26	11	23	208	2	2	2	9	0,22	++
A0A0F2BMM0	MSC_0732	50S ribosomal protein L5	-15,42	12	20	180	2	2	2	9	0,22	++
A0A0F2BMD6	MSC_0080	arginine tRNA syntethase	-18,48	10	52	454	5	5	5	23	0,22	++
A0A0F2BHQ1	MSC_0361	RmuC DNA recombinase (1 TMD)	-8,16	7	41	356	3	3	3	14	0,21	++
A0A0F2BG35	MSC_0730	50S ribosomal protein L6	-7,03	12	20	180	2	2	2	10	0,20	++
A0A0F2BHW4	MSC_0300	hypothetical ribonuclease J	-12,01	5	66	583	5	4	4	25	0,20	++
A0A0F2BQG0	MSC_0431	predicted lipoprotein DUF285	-8,14	9	40	353	3	3	3	16	0,19	++
A0A0F2BG14	MSC_0114	threonine dehydratase	-12,92	7	45	408	3	2	2	16	0,19	++
A0A0F2BJ71	MSC_0150	Peptide chain release factor 1	-10,24	9	41	364	3	3	3	17	0,18	++
A0A0F2BKF7	MSC_0971/978	UDP glucose 4 epimerase	-19,43	10	38	334	3	3	3	18	0,17	++
A0A0F2BKF8	MSC_0260	6-phosphofructokinase	-10,02	6	35	326	2	2	2	12	0,17	++
A0A126SSQ4	MSC_0301	oxydireductase	-4,49	7	26	239	2	2	2	12	0,17	++
A0A0F2BK61	MSC_0962	Transcription antitermination protein NusG	-4,86	10	24	213	2	2	2	12	0,17	++
A0A126STR6	MSC_0577	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase	-3,44	6	37	315	2	2	2	12	0,17	++
A0A140DZP1	MSC_0984	UDP galactpyranose mutase	-11,84	8	46	395	3	3	3	19	0,16	++
A0A0F2BK69	MSC_0725	adenylate kinase	-4,89	8	24	213	2	2	2	13	0,15	++
A0A126SU45	MSC_0422	ribonuclease Y (1 TMD)	-8,45	5	57	509	3	3	3	22	0,14	++
A0A0F2BHI5	MSC_0509	NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-14,05	9	52	471	4	4	4	30	0,13	++
A0A126SRH4	MSC_0481	putative dihydroxyacetone kinase	-4,36	5	61	547	3	3	3	23	0,13	++
A0A0F2BR16	MSC_0269	phosphate acyltransferase	-4,90	4	36	322	2	2	2	16	0,13	++
A0A0F2BGA6	MSC_0110/990	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	-4,51	11	33	290	2	2	2	16	0,13	++
A0A140DZH3	MSC_0110/990	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	-4,51	11	33	290	2	2	2	16	0,13	++
A0A0F2BH47	MSC_0721	DNA-directed RNA polymerase alpha chain	-8,06	5	35	317	2	2	2	16	0,13	++
A0A126SQS4	MSC_0825	phosphoglycerate mutase	-6,39	3	60	531	3	2	3	25	0,12	++
A0A0F2BP18	MSC_0829	phosphoglucomutase	-11,39	6	64	558	3	3	3	25	0,12	++
A0A126SSB6	MSC_0267	Dihydrolipoamide acetyltransferase (pyruvate dehydrogenase complex)	-18,01	8	46	428	2	2	2	17	0,12	++
A0A140DZF6	MSC_0103/0104	predicted lipoprotein	-6,37	5	42	372	2	2	2	18	0,11	++
A0A126SS16	MSC_0253	elonase	-13,17	5	49	451	2	2	2	19	0,11	++
A0A0F2BHV4	MSC_0619	ATP synthase alpha chain	-10,33	3	58	515	2	2	2	20	0,10	++
A0A109WHL4	MSC_0013	lipoprotein LppA P72	-8,68	3	63	548	2	2	2	20	0,10	++
A0A0F2BPB5	MSC_0273	PtsI PEP phosphotransferase	-9,64	3	64	573	2	2	2	21	0,10	++
A0A140DZB7	MSC_0066	seryl-tRNA synthetase	-12,27	5	49	422	2	2	2	21	0,10	++
A0A0F2BGK7	MSC_0159	elongation factor G	-14,48	4	76	689	3	3	3	33	0,09	+
A0A140DZJ6	MSC_1021/1046	predicted liporotein DUF285	-12,11	3	52	445	2	2	2	22	0,09	+
A0A0F2BLT6	MSC_0423	signal recognition particle M54	-7,47	3	50	447	2	2	2	23	0,09	+

A0A0F2BHS9	MSC_0775	predicted lipoprotein	-7,27	2	83	727	2	2	2	30	0,07	+
A0A126SRW4	MSC_0333	aspartyl-tRNA synthetase	-10,18	3	67	574	2	2	2	30	0,07	+
A0A0F2BGX7	MSC_0372	transketolase	-7,32	3	73	656	2	2	2	32	0,06	+
A0A126STV6	MSC_0539	hypothetical protein	-19,48	4	71	608	2	2	2	33	0,06	+
A0A0F2BKF9	MSC_1017	tRNA uridine 5-carboxymethylaminomethyl modification enzyme	-8,46	3	71	629	2	2	2	33	0,06	+
A0A126SR84	MSC_0776	predicted lipoprotein	-6,35	2	91	782	2	2	2	37	0,05	+
A0A0F2BMU5	MSC_0627	predicted lipoprotein (DUF31 domain)	-13,88	3	97	851	2	2	2	44	0,05	+
A0A0F2BPA4	MSC_0500	predicted lipoprotein	-8,91	2	108	970	2	2	2	46	0,04	+
A0A126SRX3	MSC_0457	FtsX-like permease family (TMD, 2 ftsX domains)	-6,17	1	201	4	2	2	2	76	0,03	+

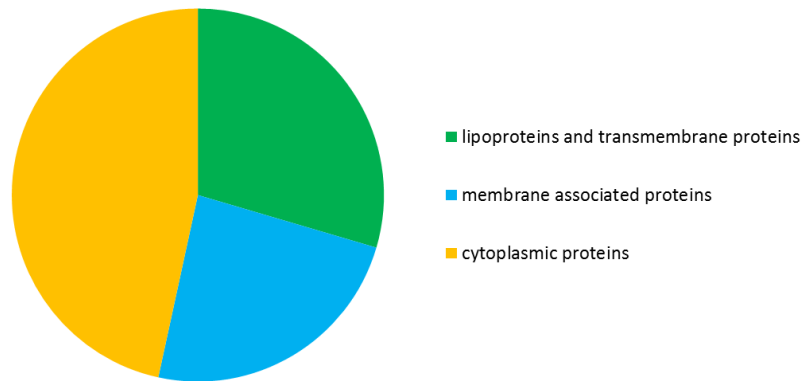
lipoproteins and transmembrane proteins
membrane associated proteins
cytoplasmic proteins

PAI semi quantitative scale: +++++: ≥ 1.0 ; +++: [0.5-1.0]; ++: [0.1-0.5]; + <0.1.

Proteins retrieved in EV from the three species are in bold

	membrane	membrane-bound	cytoplasmic
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> Afadé EV	26,00	21	41
88 proteins			
percentage	29,55	24	47

Triton X-114 fraction of *M. mycoides* subsp. *mycoides* Afadé EV



***M. fermentans* PG18^T (Triton X-114 fraction)**

Uniprot accession number	molligen accession number	predicted function	log(E value)	Coverage	MW	size	Spectra	Specific	Uniques	Specific uniques	Uniques peptide- mod- charge	Theoretical number of tryptic peptides	PAI	
C4XE63	MBIO_0170	Chaperone protein DnaK	-429,19	59	64	585	106		50		70	21	5,05	++++
C4XEI5	MBIO_0292	elongation factor TU	-463,50	71	48	434	97	7	53	4	71	22	4,41	++++
C4XFE4	MBIO_0601	lipoprotein p37	-150,66	61	28	241	52		20		35	13	4,00	++++
C4XDU3	MBIO_0050	chromosome seggregation ATPase	-277,23	73	49	426	54		34		48	14	3,86	++++
Q9RGX5	MBIO_0763	macrophage activating lipoprotein-404 precursor	-328,17	67	48	428	78	1	42	1	62	21	3,71	++++
C4XEL2	MBIO_0319	oligopeptide ABC transporter oppA (lipoprotein)	-706,58	70	106	942	146		85		113	42	3,48	++++
C4XFY0	MBIO_0787	hypothetical membrane protein (1 TMD)	-122,59	38	40	358	17		13		15	5	3,40	++++
C4XER1	MBIO_0368	hypothetical membrane protein P80-like (2 TMD)	-624,88	66	85	769	116		67		95	35	3,31	++++
Q49159	MBIO_0661	lipoprotein p29	-168,16	74	27	244	41		28		35	13	3,15	++++
C4XEV3	MBIO_0410	phosphoglycerate kinase	-280,32	82	44	401	51		36		47	21	2,43	++++
C4XDVO	MBIO_0057	Phosphopentomutase	-144,08	52	44	395	38		22		32	16	2,38	++++
C4XFT3	MBIO_0740	hypothetical membrane protein (1 TMD)	-110,53	45	30	266	23		18		23	11	2,09	++++
C4XFZ1	MBIO_0798	30S ribosomal protein S13	-26,77	41	14	123	8		6		8	4	2,00	++++
C4XFT5	MBIO_0742	hypothetical protein	-175,43	70	40	353	35		22		31	18	1,94	++++
Q5QGL0	MBIO_0017	prophage-like protein MEM (1 TMD)	-113,93	51	25	215	19		18		19	10	1,90	++++

C4XFV4	MBIO_0761	ABC transporter	-181,48	47	68	608	41		28		37	22	1,86	++++
C4XFV0	MBIO_0757	variable surface lipoprotein p78	-374,74	59	79	682	62		43		60	35	1,77	++++
C4XF62	MBIO_0519	predicted lipoprotein	-126,88	69	27	241	24		21		24	14	1,71	++++
C4XEK9	MBIO_0316	permease PTS glucose	-141,30	62	33	294	28		23		28	17	1,65	++++
C4XF61	MBIO_0518	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-124,46	48	37	339	24		15		20	15	1,60	++++
C4XFD1	MBIO_0588	hypothetical membrane protein (1 TMD)	-234,45	55	67	582	41		30		40	26	1,58	++++
C4XER2	MBIO_0369	lipoprotein nuclease family MAG5040-like	-150,13	59	46	399	29		21		28	19	1,53	++++
C4XFW7	MBIO_0774	hypothetical membrane protein (1 TMD)	-512,02	49	148	1274	92		69		90	61	1,51	++++
C4XEA1	MBIO_0208	predicted lipoprotein	-42,28	34	14	117	7		6		7	5	1,40	++++
C4XG16	MBIO_0823	30S ribosomal protein S10	-36,23	59	11	101	7		6		7	5	1,40	++++
C4XEU2	MBIO_0399	hypothetical membrane protein (4 TMD)	-37,20	19	28	244	8		5		6	6	1,33	++++
C4XFT4	MBIO_0741	hypothetical membrane protein (4 TMD)	-24,57	18	22	181	8		3		6	6	1,33	++++
C4XEV0	MBIO_0407	Triosephosphate isomerase	-69,41	41	29	262	13		9		13	10	1,30	++++
C4XFE5	MBIO_0602	Alkylphosphonate ABC transporter	-76,29	38	29	250	14		10		14	11	1,27	++++
C4XE16	MBIO_0123	hypothetical membrane protein DUF3137 domain (2 TMD)	-81,78	42	42	365	16		12		15	13	1,23	++++
C4XG62	MBIO_0869	predicted lipoprotein	-205,18	42	88	792	43		34		42	35	1,23	++++
C4XEN1	MBIO_0338	predicted lipoprotein	-192,38	53	65	569	32		29		31	27	1,19	++++
C4XEC7	MBIO_0234	hypothetical membrane protein (1 TMD)	-173,35	43	57	493	26		21		26	22	1,18	++++
C4XEX3	MBIO_0430	Deoxyadenosine kinase	-64,62	54	28	230	13		11		13	11	1,18	++++
C4XG83	MBIO_0890	hypothetical membrane protein (1 TMD)	-375,50	49	148	1278	69	35	58	29	67	60	1,15	++++
C4XEW1	MBIO_0418	hypothetical membrane protein (2 TMD)	-73,52	32	51	437	17		14		17	15	1,13	++++
C4XEM3	MBIO_0330	Phosphoglycerate mutase	-83,16	32	57	507	18		15		18	16	1,13	++++
C4XEC6	MBIO_0233	Pyruvate kinase	-98,34	41	53	477	19		18		19	17	1,12	++++
C4XFZ8	MBIO_0805	30S ribosomal protein S5	-43,32	37	26	239	11		8		11	10	1,10	++++
C4XE71	MBIO_0178	Chaperone protein DnaJ	-100,76	45	42	373	17		14		17	16	1,06	++++
C4XDX7	MBIO_0084	30S ribosomal protein S12	-14,10	18	15	139	3		3		3	3	1,00	++++
C4XDX8	MBIO_0085	30S ribosomal protein S7	-38,96	56	18	156	7		6		7	7	1,00	++++
C4XEB8	MBIO_0225	30S ribosomal protein S9	-15,60	26	15	139	2		2		2	2	1,00	++++
C4XEF7	MBIO_0264	predicted lipoprotein	-6,53	11	31	279	2		2		2	2	1,00	++++
C4XEM5	MBIO_0332	hypothetical membrane protein (3 TMD)	-14,22	11	39	343	3		2		2	3	1,00	++++
C4XEN0	MBIO_0337	hypothetical protein	-86,49	49	37	322	16		14		15	16	1,00	++++
C4XEY1	MBIO_0438	amino acid permease	-48,19	10	65	591	6		5		6	6	1,00	++++
C4XFC6	MBIO_0583	hypothetical membrane protein (3 TMD)	-6,03	12	16	139	3		2		2	3	1,00	++++
C4XFJ0	MBIO_0647	lipoprotein BspA-like leucine rich repat protein	-51,13	40	28	248	9		9		9	9	1,00	++++
C4XFK9	MBIO_0666	YebC/PmpR family regulator	-24,32	14	28	251	5		4		5	5	1,00	++++
C4XFN7	MBIO_0694	hypothetical membrane protein (3 TMD)	-9,95	20	14	128	2		2		2	2	1,00	++++
C4XDX9	MBIO_0086	Translation elongation factor G	-164,97	43	77	696	30		23		29	31	0,97	+++
O06762	MBIO_0759	ABC transporter	-49,54	14	62	536	13		12		13	14	0,93	+++
C4XER3	MBIO_0370	ABC transporter	-160,03	39	82	703	32		27		32	35	0,91	+++
C4XEX5	MBIO_0432	hypothetical membrane protein (1 TMD)	-36,03	32	28	242	10		9		9	11	0,91	+++

C4XE89	MBIO_0196	trigger factor (prolyl isomerase)	-98,61	32	59	511	18		17		18	20	0,90	+++
C4XEL6	MBIO_0323	oligopeptide ABC transporter	-183,53	36	104	889	35	34	32	31	35	39	0,90	+++
C4XFT0	MBIO_0737	hypothetical membrane protein (4 TMD)	-22,38	21	37	322	6		6		6	7	0,86	+++
C4XFM0	MBIO_0677	lipoprotein	-241,57	43	106	932	42		37		41	52	0,81	+++
C4XFT9	MBIO_0746	hypothetical membrane protein (5 TMD)	-155,43	37	77	663	25		23		25	31	0,81	+++
C4XEX4	MBIO_0431	Transcription elongation factor GreA	-35,09	28	18	163	4		4		4	5	0,80	+++
C4XFS0	MBIO_0727	hypothetical membrane protein (1 TMD)	-41,30	39	24	197	8		7		8	10	0,80	+++
C4XEL5	MBIO_0322	oligopeptide ABC transporter oppD	-84,75	34	42	372	11		10		11	14	0,79	+++
C4XG31	MBIO_0838	hypothetical membrane protein (1 TMD)	-32,97	32	28	244	6		6		6	8	0,75	+++
C4XFD5	MBIO_0592	glucose 6P isomerase	-75,73	33	48	426	17		14		17	23	0,74	+++
C4XF05	MBIO_0462	elongation factor TS	-65,61	28	32	294	10		9		10	14	0,71	+++
C4XF76	MBIO_0533	lipoprotein P60-like	-99,89	37	51	445	15		15		15	21	0,71	+++
O06763	MBIO_0758	sugar ABC transporter	-24,60	10	36	326	5		3		5	7	0,71	+++
C4XFW4	MBIO_0771	permidine/putrescine ABC transporter	-47,96	27	37	323	10		9		10	14	0,71	+++
C4XDT4	MBIO_0041	predicted lipoprotein	-70,61	33	68	597	21		20		21	30	0,70	+++
C4XFB4	MBIO_0571	hypothetical membrane protein (1 TMD)	-203,86	29	147	1271	43	9	38	9	42	63	0,68	+++
C4XEX0	MBIO_0427	glucosamine-6-phosphate deaminase	-31,63	33	29	251	6		6		6	9	0,67	+++
C4XF82	MBIO_0539	hypothetical membrane protein (1 TMD)	-17,23	16	16	146	2		2		2	3	0,67	+++
C4XFD0	MBIO_0587	glycyl-tRNA synthetase	-91,99	37	54	466	16		15		16	24	0,67	+++
C4XFY8	MBIO_0795	50S ribosomal protein L17	-11,57	15	18	158	2		2		2	3	0,67	+++
C4XG01	MBIO_0808	30S ribosomal protein S8	-27,70	45	15	134	4		4		4	6	0,67	+++
C4XER7	MBIO_0374	lipoprotein	-96,81	36	59	502	17		16		17	26	0,65	+++
C4XEL4	MBIO_0321	ABC transporter oligopeptide oppC	-54,37	28	45	403	11		9		11	17	0,65	+++
C4XFY4	MBIO_0790	COF family HAD hydrolase	-44,10	32	33	292	7		6		7	11	0,64	+++
C4XEL3	MBIO_0320	ABC transporter oligopeptide oppB	-35,25	15	42	365	5		4		5	8	0,63	+++
C4XF18	MBIO_0645	Lipoate-protein ligase A	-38,36	26	38	336	10		9		10	16	0,63	+++
C4XF52	MBIO_0509	serine/threonine protein kinase (1TMD)	-46,67	29	38	332	8		8		8	13	0,62	+++
C4XF89	MBIO_0546	hypothetical membrane protein (1 TMD)	-90,24	30	82	696	19		18		18	31	0,61	+++
C4XEL0	MBIO_0317	D-lactate dehydrogenase	-75,70	39	39	350	11		11		11	18	0,61	+++
C4XDV8	MBIO_0065	hypothetical membrane protein (3 TMD)	-6,35	15	22	187	3		3		3	5	0,60	+++
C4XEY0	MBIO_0437	predicted lipoprotein	-13,58	23	15	127	3		3		3	5	0,60	+++
C4XF11	MBIO_0638	hypothetical protein	-28,98	38	19	164	6		5		6	10	0,60	+++
C4XFS3	MBIO_0730	predicted lipoprotein	-36,56	33	25	214	6		6		6	10	0,60	+++
C4XG71	MBIO_0878	50S ribosomal protein L27	-14,74	26	14	132	3		3		3	5	0,60	+++
C4XG09	MBIO_0816	30S ribosomal protein S3	-31,46	26	25	225	7		7		7	12	0,58	+++
C4XEK0	MBIO_0307	ATP synthase alpha chain	-53,88	21	58	528	10		10		10	18	0,56	+++
C4XG12	MBIO_0819	50S ribosomal protein L2	-31,60	24	31	283	5		5		5	9	0,56	+++
C4XFN0	MBIO_0687	Cell division protein FtsH (2 TMD)	-122,48	23	78	708	16		14		16	29	0,55	+++
C4XE74	MBIO_0181	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphateacyl transferase PlsC	-24,52	25	30	257	7		6		7	13	0,54	+++
C4XF53	MBIO_0510	phosphatase	-33,84	36	29	260	7		7		7	13	0,54	+++

C4XDX0	MBIO_0077	predicted lipoprotein	-108,19	33	92	784	23		21	22	43	0,53	+++
C4XE31	MBIO_0138	InfB Translation initiation factor 2	-93,26	30	66	601	15		13	15	30	0,50	+++
C4XE57	MBIO_0164	hypothetical membrane protein (4 TMD)	-77,19	21	55	487	9		9	9	18	0,50	+++
C4XEP3	MBIO_0350	Single-stranded DNA-binding protein	-12,79	15	20	179	2		2	2	4	0,50	+++
C4XES8	MBIO_0385	Heat shock protein GrpE	-49,98	22	48	418	8		8	8	16	0,50	+++
C4XES9	MBIO_0386	mechanosensitive ion channel	-10,32	20	15	139	2		2	2	4	0,50	+++
C4XEV4	MBIO_0411	PTS glucose permease	-17,08	26	16	137	3		2	3	6	0,50	+++
C4XF17	MBIO_0474	hypothetical membrane protein (1 TMD)	-21,07	33	22	193	5		5	5	10	0,50	+++
C4XFS1	MBIO_0728	potassium channel	-24,33	4	45	391	5		3	5	10	0,50	+++
C4XF77	MBIO_0534	hypothetical membrane protein (1 TMD)	-100,28	34	85	735	18		18	18	37	0,49	++
C4XEJ3	MBIO_0300	Signal recognition particle, subunit Ffh SRP54	-47,75	25	51	459	11		10	11	23	0,48	++
C4XFU2	MBIO_0749	Seryl-tRNA synthetase	-35,68	28	48	423	10		8	8	21	0,48	++
C4XF16	MBIO_0473	Mg/Co/Ni transporter MgtE	-40,43	20	54	480	6		6	6	13	0,46	++
C4XE69	MBIO_0176	Serine hydroxymethyltransferase	-54,29	30	47	424	10		9	10	22	0,45	++
Q9RFP7	MBIO_0636	hypothetical protein	-19,02	17	27	232	5		5	5	11	0,45	++
C4XEC4	MBIO_0231	Fructose-bisphosphate aldolase	-31,77	22	31	287	4		4	4	9	0,44	++
C4XEX1	MBIO_0428	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	-23,98	21	22	196	4		4	4	9	0,44	++
C4XFQ8	MBIO_0715	ATP-dependent ClpB protein	-88,94	26	84	741	16		16	16	36	0,44	++
C4XFK0	MBIO_0657	Ascorbate-specific PTS system, EIIC component	-43,62	10	77	712	7		5	7	16	0,44	++
C4XFW3	MBIO_0770	DNA polymerase III subunits gamma and tau	-78,42	24	70	612	14		13	14	32	0,44	++
C4XFT7	MBIO_0744	Transketolase	-89,50	28	73	648	13		13	13	30	0,43	++
C4XEQ4	MBIO_0361	hypothetical protein	-24,51	20	33	290	6		5	6	14	0,43	++
C4XF64	MBIO_0521	N-acetylglucosamine-specific IIC IIB component	-40,74	11	62	585	6		5	6	14	0,43	++
C4XF80	MBIO_0537	Ribosome recycling factor	-15,55	15	21	183	3		2	3	7	0,43	++
C4XED8	MBIO_0245	hypothetical membrane protein (1 TMD)	-26,57	12	37	328	5		3	5	12	0,42	++
C4XES5	MBIO_0382	30S ribosomal protein S4	-36,61	24	25	216	5		5	5	12	0,42	++
C4XET2	MBIO_0389	Translation initiation factor 3	-31,83	25	25	218	5		5	5	12	0,42	++
C4XFW6	MBIO_0773	Purine nucleoside phosphorylase	-31,26	21	27	236	5		5	5	12	0,42	++
C4XEV7	MBIO_0414	Threonyl-tRNA synthetase	-69,55	26	68	582	13		13	13	32	0,41	++
C4XFI9	MBIO_0646	N-acetylglucosamine-specific IIAABC component	-65,25	17	97	885	13		12	13	32	0,41	++
C4XEQ7	MBIO_0364	Oligopeptide transport ATP-binding protein OppF	-86,29	18	102	863	17	16	15	14	42	0,40	++
C4XE47	MBIO_0154	Signal recognition particle receptor protein FtsY (membrane)	-28,94	17	40	355	6		6	6	15	0,40	++
C4XEK2	MBIO_0309	ATP synthase beta chain	-66,66	21	55	502	8		8	8	20	0,40	++
C4XEP2	MBIO_0349	30S ribosomal protein S6	-9,76	12	18	157	2		2	2	5	0,40	++
C4XEW9	MBIO_0426	GTPase ObgE	-48,91	22	47	426	10		9	10	25	0,40	++
C4XFZ4	MBIO_0801	Adenylate kinase	-41,75	34	26	228	6		6	6	15	0,40	++
C4XG03	MBIO_0810	50S ribosomal protein L5	-37,07	28	21	183	4		4	4	10	0,40	++
C4XFK7	MBIO_0664	Fructose-6-phosphate phosphoketolase	-73,44	18	90	792	13		11	13	33	0,39	++
Q8GCK7	MBIO_0560	lipoprotein p57	-38,42	17	62	522	9		8	9	23	0,39	++
C4XDP4	MBIO_0001	putrescine transport ATP-binding protein PotA	-39,55	18	55	465	7		6	7	18	0,39	++

C4XF04	MBIO_0461	30S ribosomal protein S2	-38,27	27	38	330	7	7	7	18	0,39	++
C4XDR6	MBIO_0023	Type I restriction-modification system, DNA-methyltransferase	-58,59	28	59	503	10	10	10	26	0,38	++
C4XE61	MBIO_0168	HAD hydrolase	-24,96	20	35	310	5	5	5	13	0,38	++
C4XEY6	MBIO_0443	hypothetical protein	-45,29	28	35	304	8	7	8	21	0,38	++
C4XFN6	MBIO_0693	50S ribosomal protein L11	-21,32	20	22	202	3	3	3	8	0,38	++
C4XG36	MBIO_0843	hypothetical protein	-31,88	25	34	297	6	6	6	16	0,38	++
Q9X495	MBIO_0764	hypothetical protein	-48,00	23	62	550	10	10	10	27	0,37	++
C4XDU6	MBIO_0053	putative dihydroxyacetone kinase	-30,35	18	59	541	7	7	7	19	0,37	++
C4XER8	MBIO_0375	hypothetical membrane protein (1 TMD)	-40,54	15	50	435	7	6	7	19	0,37	++
C4XDZ7	MBIO_0104	hypothetical membrane protein (5 TMD)	-75,96	17	83	708	11	11	11	30	0,37	++
C4XDV9	MBIO_0066	Copper-translocating P-type ATPase (10 TMD)	-98,29	20	99	900	12	11	12	33	0,36	++
C4XEY8	MBIO_0445	PTS enzyme I	-69,54	23	67	593	10	9	10	28	0,36	++
C4XG15	MBIO_0822	50S ribosomal protein L3	-16,39	20	30	276	5	5	5	14	0,36	++
C4XDY6	MBIO_0093	50S ribosomal protein L7/L12	-7,42	18	13	123	2	2	2	6	0,33	++
C4XDZ1	MBIO_0098	hypothetical membrane protein (2 TMD)	-45,91	14	74	656	9	9	9	27	0,33	++
C4XE42	MBIO_0149	30S ribosomal protein S16	-10,26	13	19	171	2	2	2	6	0,33	++
C4XF08	MBIO_0465	hypothetical protein	-33,51	21	35	301	4	4	4	12	0,33	++
C4XFN8	MBIO_0695	ribonuclease J	-65,65	21	72	644	11	11	11	33	0,33	++
C4XFZ7	MBIO_0804	50S ribosomal protein L15	-11,59	14	17	154	2	2	2	6	0,33	++
C4XEH1	MBIO_0278	lipoprotein	-46,96	18	60	510	8	7	8	25	0,32	++
C4XDV7	MBIO_0064	Ribosome-binding ATPase	-29,20	19	41	366	6	6	6	19	0,32	++
C4XEA3	MBIO_0210	GTP-binding protein	-19,95	13	50	435	6	5	6	19	0,32	++
C4XEA4	MBIO_0211	Cytidylate kinase	-22,95	23	26	228	4	4	4	13	0,31	++
C4XED1	MBIO_0238	Phosphate acetyltransferase	-32,31	22	35	317	4	4	4	13	0,31	++
C4XEW5	MBIO_0422	6-phosphofructokinase	-12,75	10	37	338	4	4	4	13	0,31	++
C4XF26	MBIO_0483	membrane protein (1 TMD)	-15,52	15	35	306	4	4	4	13	0,31	++
C4XFP3	MBIO_0700	Hydrolase of the HAD superfamily	-8,58	12	32	284	4	3	3	13	0,31	++
C4XF55	MBIO_0512	hypothetical membrane protein (2 TMD)	-34,73	16	51	436	6	6	6	20	0,30	++
C4XE19	MBIO_0126	XAA-PRO aminopeptidase	-20,09	15	42	365	5	5	5	17	0,29	++
C4XEU8	MBIO_0405	predicted lipoprotein	-43,20	20	43	371	5	5	5	17	0,29	++
C4XE33	MBIO_0140	Transcription termination protein NusA	-39,37	20	61	538	7	7	7	24	0,29	++
C4XDY9	MBIO_0096	Replicative DNA helicase	-27,84	17	54	474	6	6	6	21	0,29	++
C4XE97	MBIO_0204	hypothetical membrane protein (5 TMD)	-33,25	14	62	548	6	6	6	21	0,29	++
C4XF10	MBIO_0637	hypothetical protein	-8,58	13	21	184	2	2	2	7	0,29	++
C4XFU9	MBIO_0756	Thioredoxin	-18,86	28	12	104	2	2	2	7	0,29	++
C4FXF0	MBIO_0777	Peptide chain release factor 1	-36,26	20	42	373	7	7	7	25	0,28	++
C4XFG7	MBIO_0624	Isoleucyl-tRNA synthetase	-56,74	17	103	893	12	12	12	43	0,28	++
C4XED5	MBIO_0242	Methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase	-11,99	11	33	298	3	3	3	11	0,27	++
C4AFX3	MBIO_0780	Transcription antitermination protein NusG	-6,72	12	24	205	3	3	3	11	0,27	++

C4XG14	MBIO_0821	50S ribosomal protein L4	-13,81	6	41	378	3	3	3	11	0,27	++
C4XEI0	MBIO_0287	hypothetical protein	-27,75	21	27	235	4	3	4	15	0,27	++
C4XEP1	MBIO_0348	DNA topoisomerase I	-61,66	16	72	629	8	8	8	30	0,27	++
C4XEM6	MBIO_0333	Preprotein translocase SecA	-65,05	19	97	841	13	13	13	49	0,27	++
C4XEN2	MBIO_0339	membrane ribonuclease (1 TMD)	-39,60	18	57	508	7	7	7	27	0,26	++
C4XDU2	MBIO_0049	hypothetical membrane protein (5 TMD)	-9,14	7	35	302	2	2	2	8	0,25	++
C4XE70	MBIO_0177	MatE efflux permease	-18,70	8	69	612	4	4	4	16	0,25	++
C4XEA0	MBIO_0207	Thiol peroxidase	-9,68	8	19	169	2	2	2	8	0,25	++
C4XED0	MBIO_0237	Acetate kinase	-15,57	10	44	398	4	4	4	16	0,25	++
C4XEP4	MBIO_0351	30S ribosomal protein S18	-12,18	33	12	97	2	2	2	8	0,25	++
C4XEW6	MBIO_0423	lipoprotein hydrolase HAD	-7,70	12	32	275	3	3	3	12	0,25	++
Q6GYZ9	MBIO_0496	Thymidine kinase	-18,17	9	22	192	2	2	2	8	0,25	++
C4XFS2	MBIO_0729	hypothetical membrane protein (1 TMD)	-30,79	14	77	654	9	8	8	38	0,24	++
C4XEM2	MBIO_0329	predicted lipoprotein	-36,45	15	64	597	6	6	6	26	0,23	++
C4XFN4	MBIO_0691	Cholinephosphate cytidyltransferase	-49,40	15	70	608	6	6	6	26	0,23	++
C4XFR3	MBIO_0720	DNA-methyltransferase subunit M	-20,66	14	64	560	6	6	6	26	0,23	++
C4XFC1	MBIO_0578	ATP-dependent protease La (heat shock)	-67,16	12	116	1016	11	10	11	48	0,23	++
C4XFL0	MBIO_0667	NAD synthetase	-26,26	16	30	270	3	3	3	14	0,21	++
Q8GCM8	MBIO_0549	hypothetical protein	-39,56	13	83	700	7	7	7	34	0,21	++
C4XDW7	MBIO_0074	sulfuryl transferase	-9,47	3	43	377	2	2	2	10	0,20	++
C4XEQ6	MBIO_0363	hypothetical membrane protein (1 TMD)	-19,08	6	39	336	4	4	4	20	0,20	++
C4XF46	MBIO_0503	Prolipoprotein diacylglycerol transferase	-6,73	9	36	310	2	2	2	10	0,20	++
C4XFI7	MBIO_0644	Esterase/lipase	-13,72	15	34	293	3	3	3	15	0,20	++
C4XES3	MBIO_0380	DNA gyrase subunit A	-26,22	9	96	854	7	7	7	36	0,19	++
C4XFU6	MBIO_0753	DNA gyrase subunit B	-43,32	15	72	644	6	6	6	31	0,19	++
C4XF12	MBIO_0469	glycosyltransferase	-15,89	11	40	335	4	4	4	21	0,19	++
C4XFN2	MBIO_0689	ABC transporter	-21,19	11	42	368	3	3	3	16	0,19	++
C4XE99	MBIO_0206	Purine nucleoside phosphorylase	-5,79	10	26	237	2	2	2	11	0,18	++
C4XEV1	MBIO_0408	Glucosamine-6-phosphate deaminase	-9,82	8	28	245	2	2	2	11	0,18	++
C4XF54	MBIO_0511	Guanylate kinase	-8,35	11	25	212	2	2	2	11	0,18	++
C4XFY5	MBIO_0792	Transmembrane component of ECF transporters (5 TMD)	-7,06	9	34	289	2	2	2	11	0,18	++
C4XFU5	MBIO_0752	hypothetical membrane protein (6 TMD)	-21,64	8	56	495	3	3	3	17	0,18	++
C4XEJ0	MBIO_0297	hypothetical membrane protein (1 TMD)	-29,84	11	77	659	6	6	6	35	0,17	++
C4XEX7	MBIO_0434	Alanyl-tRNA synthetase	-44,22	10	100	875	7	7	7	41	0,17	++
Q5QGL4	MBIO_0014	hypothetical protein	-10,03	8	37	330	2	2	2	12	0,17	++
C4XDU5	MBIO_0052	fatty acid/phospholipid synthesis protein (PlsX)	-12,28	11	38	350	3	3	3	18	0,17	++
C4XDV3	MBIO_0060	DNA polymerase III, delta subunit	-8,49	8	37	321	2	2	2	12	0,17	++
C4XEN6	MBIO_0343	DNA-directed RNA polymerase beta chain	-56,11	12	136	1214	10	10	10	60	0,17	++
C4XES7	MBIO_0384	Heat-inducible transcription repressor HrcA	-15,84	12	38	341	3	3	3	18	0,17	++
C4XF45	MBIO_0502	hypotheticalr kinase/phosphorylase	-6,36	9	35	313	2	2	2	12	0,17	++

C4XF84	MBIO_0541	DNA polymerase I	-8,81	9	34	300	2	2	2	12	0,17	++
C4XF87	MBIO_0544	lipoprotein acid phosphatase	-22,40	12	41	367	3	3	3	18	0,17	++
C4XFU4	MBIO_0751	Esterase/lipase	-9,98	10	36	310	3	3	3	18	0,17	++
C4XG35	MBIO_0842	Glutamyl-tRNA(Gln) synthetase	-18,79	7	54	463	3	3	3	18	0,17	++
Q8GCP5	MBIO_0401	Translation elongation factor LepA	-22,85	7	68	599	4	4	4	26	0,15	++
C4XEW4	MBIO_0421	Purine nucleoside phosphorylase	-8,96	10	26	234	2	2	2	13	0,15	++
C4XF42	MBIO_0499	Phosphate transport ATP-binding protein PstB	-11,19	15	29	256	2	2	2	13	0,15	++
C4XFQ0	MBIO_0707	prolyl-tRNA synthetase	-15,93	10	56	482	4	4	4	26	0,15	++
C4XEW3	MBIO_0420	Pyrimidine-nucleoside phosphorylase	-25,84	11	47	432	3	3	3	20	0,15	++
C4XDW8	MBIO_0075	hypothetical membrane protein (1 TMD)	-13,40	8	63	533	4	4	4	28	0,14	++
C4XEP6	MBIO_0353	hypothetical protein	-8,97	9	47	412	3	3	3	21	0,14	++
C4XG44	MBIO_0851	histidyl-tRNA synthetase	-27,76	10	53	454	3	3	3	21	0,14	++
C4XFM2	MBIO_0679	DNA polymerase III, beta chain	-16,48	9	42	369	3	3	3	22	0,14	++
C4XFC8	MBIO_0585	RNA polymerase sigma factor RpoD	-9,60	5	57	489	2	2	2	15	0,13	++
C4XFL4	MBIO_0671	Tyrosyl-tRNA synthetase	-14,16	6	49	431	2	2	2	15	0,13	++
Q9X493	MBIO_0766	DNA polymerase III subunit	-8,86	10	35	305	2	2	2	15	0,13	++
C4XEE4	MBIO_0251	ATP-binding helicase (1 TMD)	-36,83	9	130	1113	8	8	8	61	0,13	++
C4XEP7	MBIO_0354	ABC transporter	-20,14	8	64	560	3	3	3	23	0,13	++
C4XF15	MBIO_0472	Aminopeptidase C	-19,30	9	51	443	3	3	3	23	0,13	++
C4XG17	MBIO_0824	hypothetical membrane protein (1 TMD)	-19,36	6	102	881	5	5	5	39	0,13	++
C4XE35	MBIO_0142	oligoribonuclease A	-7,73	7	38	336	2	2	2	16	0,13	++
C4XE79	MBIO_0186	Glutamyl-tRNA amidotransferase subunit A	-17,42	6	49	440	2	2	2	17	0,12	++
C4XF15	MBIO_0642	UDP glucose 4 epimerase	-16,92	11	38	331	2	2	2	17	0,12	++
C4XFT2	MBIO_0739	hypothetical protein	-11,88	8	33	281	2	2	2	17	0,12	++
C4XEY5	MBIO_0442	DUF2779 hypothetical protein	-17,95	6	89	752	4	4	4	35	0,11	++
C4XE45	MBIO_0152	DUF4143 hypothetical protein	-5,68	5	58	490	3	3	3	27	0,11	++
Q6GYZ8	MBIO_0497	Cytosol aminopeptidase PepA	-14,20	6	41	375	2	2	2	18	0,11	++
C4XFY9	MBIO_0796	DNA-directed RNA polymerase alpha subunit	-13,56	7	38	339	2	2	2	18	0,11	++
C4XF81	MBIO_0538	hypothetical membrane protein (2 TMD)	-5,18	4	53	445	2	2	2	19	0,11	++
C4XF44	MBIO_0501	phosphate-binding protein PstS (1 TMD)	-12,44	6	44	378	2	2	2	20	0,10	++
C4XG48	MBIO_0855	ABC transporter	-4,02	2	70	615	2	2	2	21	0,10	++
C4XFK6	MBIO_0663	DNA methyltransferase	-10,70	6	59	505	2	2	2	23	0,09	+
C4XF57	MBIO_0514	exoribonuclease RNase R	-5,12	6	84	727	3	3	3	36	0,08	+
C4XEI4	MBIO_0291	phosphoglucomutase/phosphomannomutase	-16,95	4	116	1003	4	4	4	51	0,08	+
C4XEX9	MBIO_0436	Arginyl-tRNA synthetase	-7,85	4	63	550	2	2	2	27	0,07	+
C4XE80	MBIO_0187	Glutamyl-tRNA amidotransferase subunit B	-12,89	5	54	475	2	2	2	28	0,07	+
C4XEH6	MBIO_0283	hypothetical membrane protein (2 TMD)	-8,03	3	145	1232	4	4	4	57	0,07	+
C4XF59	MBIO_0516	Methionyl-tRNA synthetase	-11,33	5	61	516	2	2	2	29	0,07	+
C4XFN1	MBIO_0688	FtsX domain, membrane protein (7 TMD)	-39,59	4	306	2684	8	8	8	117	0,07	+
C4XG28	MBIO_0835	Mg(2+) transport ATPase, P-type	-6,63	2	103	918	2	2	2	32	0,06	+

C4XF85	MBIO_0542	hypothetical protein	-12,34	5	79	665	2	2	2	35	0,06	+
C4XEE0	MBIO_0247	hypothetical protein	-13,73	2	99	830	2	2	2	43	0,05	+
C4XF83	MBIO_0540	DNA polymerase III, alpha subunit	-10,58	2	111	967	2	2	2	53	0,04	+
C4XEN7	MBIO_0344	DNA-directed RNA polymerase beta' subunit	-5,10	1	170	1506	2	2	2	65	0,03	+

lipoproteins and transmembrane proteins
membrane associated proteins
cytoplasmic proteins

PAI semi quantitative scale: ++++: ≥ 1.0 ; +++: $[0.5-1.0]$; ++: $[0.1-0.5]$; + < 0.1 .

Proteins retrieved in EV from the three species are in bold

	membrane	membrane-bound	cytoplasmic
<i>M. fermentans</i> PG18 ^T EV	107,00	34	117
258 proteins			
percentage	41,47	13	45

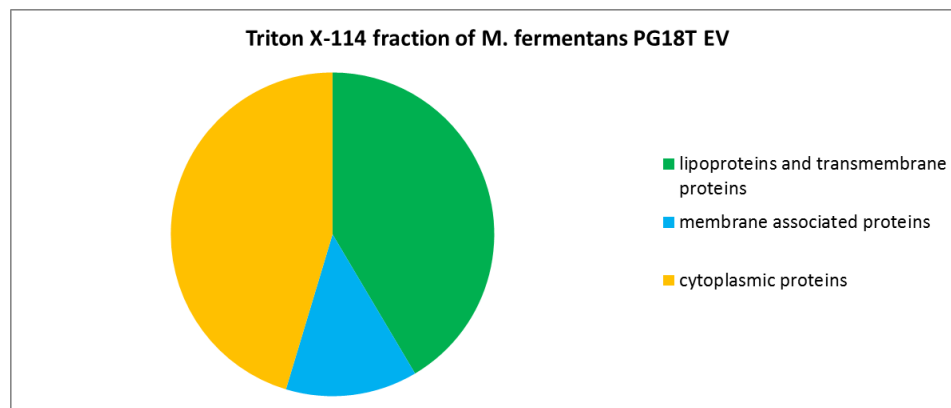
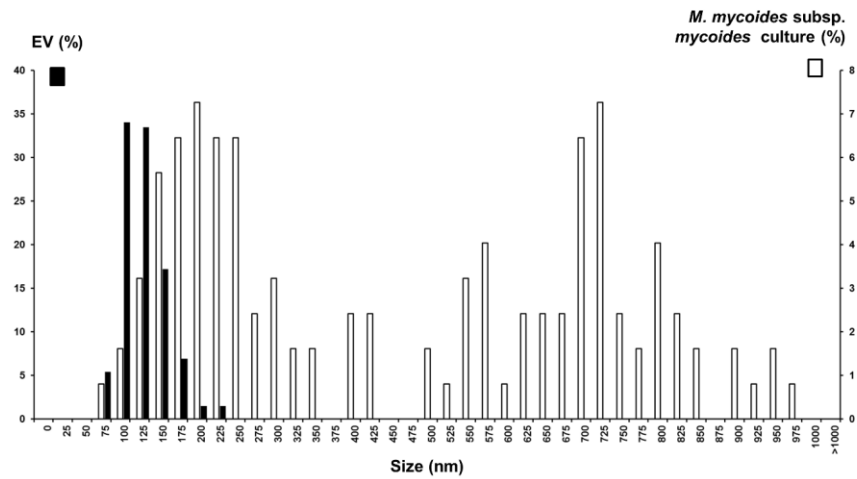
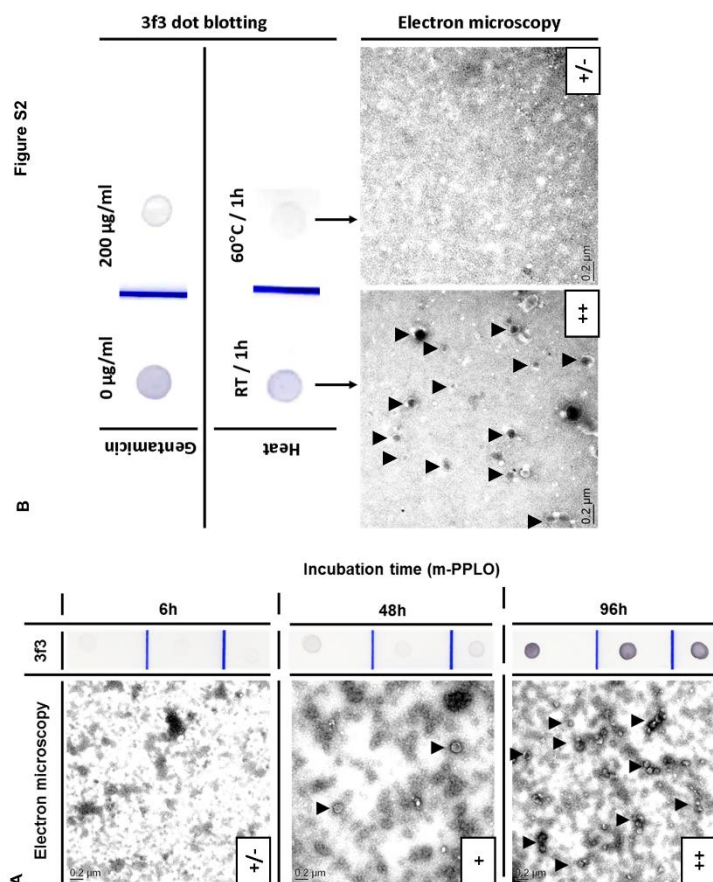


Figure S1



S1 Fig. Comparison of size distribution of EV (n = 322, three production batches) purified from *M. mycoides* subsp. *mycoides* Afadé (black bars) and cells (n = 124) from a stationary phase culture of *M. mycoides* subsp. *mycoides* Afadé (white bars).

EV and cells were observed by TEM after negative staining and diameter was estimated using ImageJ.



S2 Fig. **A. Validation of 3f3 dot blotting for EV semi-quantification.** EV were extracted from 6 h, 48 h and 96 h cultures of *M. mycoides* subsp. *mycoides* strain Afadé in m-PPLO medium. Three production batches were done for each time point. EV are indicated by black arrowheads on electron micrographs. Their density was estimated by counting the number of EV per 5 µm² fields (scale: +/-, counts <1 EV/ 5µm²; +, 1–10 EV/ 5µm²; ++, 10–100 EV/ 5µm²). Dot blotting with 3f3 was performed on 2µl EV extract for each time point and each batch. The intensity of dot blotting correlates with the EV density in electron micrographs. **B. Requirement of *Mycoplasma* viable cells for EV production.** *M. mycoides* subsp. *mycoides* strain Afadé cultivated in m-PPLO medium (10⁸–10⁹ cfu/ml) was submitted to heat (1h at 60°C, no more viable cells) or chemical (200 µg/ml gentamicin, viability was reduced to 10² and 10⁷ cfu/ml with or without gentamicin, respectively) inactivation before EV purification (for details see the Materials and methods section). EV (indicated by black arrowheads) density was estimated by counting on electron micrographs and/or by 3f3 dot-blotting (see panel A). When mycoplasma cells were killed no EV were produced.

LISTE DES COMMUNICATIONS:

- **2019** : Ganter S., Villard A., Manso-Silvan L., Chevret D., Boulé C., Monnet V., Tardy F., Gaurivaud P. 2019. Extracellular vesicles secretion by *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*, the etiological agent of contagious bovine pleuropneumonia. In : Chalker Vicki (ed.), Spiller Brad (ed.). *Book of abstracts of the European Mycoplasma Conference, London 2019*. Londres : FEMS, p. 47-47. European Mycoplasma Conference London, 2019-03-18/2019-03-19, Londres (Royaume-Uni). **(Communication orale)**
- **2018** : Ganter S., Villard A., Manso-Silvan L., Chevret D., Boulé C., Monnet V., Tardy F., Gaurivaud P. 2018. Les vésicules extracellulaires : un nouvel intervenant dans l'interface mycoplasme-hôte. In : *Actes de conférences : Journées scientifiques et doctorales*. Paris : ANSES. **(Communication orale)**
- **2018** : Ganter S., Totté P., Thiaucourt F., Manso-Silvan L., Tardy F., Gaurivaud P. 2018. Le secretome peptidasique des mycoplasmes. In : *Actes de conférences : Le printemps de Baillarguet*. Montpellier : CIRAD, p. 18-18. Le printemps de Baillarguet 2018. 10, 2018-05-28/2018-05-29, Montpellier. **(Communication orale)**
<http://printemps-baillarguet.e-monsite.com/pages/acte-de-conference-2018.html>
- **2017** : Ganter S., Gaurivaud P., Totté P., Tardy F., Thiaucourt F. Etude du sécrétome protéique des mycoplasmes, rôle dans la virulence. In : *Journées scientifiques et doctorales*. Paris : ANSES **(Poster)**

Références bibliographiques:

- Abdi, A., L. Yu, D. Goulding, M. K. Rono, P. Bejon, J. Choudhary and J. Rayner (2017). "Proteomic analysis of extracellular vesicles from a *Plasmodium falciparum* Kenyan clinical isolate defines a core parasite secretome." Wellcome Open Res **2**: 50.
- Abdo, E.-M., J. Nicolet, R. Miserez, R. Gonçalves, J. Regalla, C. Griot, A. Bensaïde, M. Krampe and J. Frey (1998). "Humoral and bronchial immune responses in cattle experimentally infected with *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type." Veterinary Microbiology **59**(2): 109-122.
- Abdo, E. M., J. Nicolet and J. Frey (2000). "Antigenic and genetic characterization of lipoprotein LppQ from *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC." Clinical and diagnostic laboratory immunology **7**(4): 588-595.
- Abramowicz, A., P. Widlak and M. Pietrowska (2016). "Proteomic analysis of exosomal cargo: the challenge of high purity vesicle isolation." Mol Biosyst **12**(5): 1407-1419.
- Adams, C., J. Pitzer and F. C. Minion (2005). "In vivo expression analysis of the P97 and P102 paralog families of *Mycoplasma hyopneumoniae*." Infect Immun **73**(11): 7784-7787.
- Agnone, A., M. La Manna, G. Sireci, R. Puleio, A. Usticino, U. Ozdemir, R. A. J. Nicholas, V. Chiaracane, F. Dieli, V. Di Marco and G. R. Loria (2013). "A comparison of the efficacy of commercial and experimental vaccines for contagious agalactia in sheep." Small Ruminant Research **112**(1) : 230-234.
- Allam, A. B., M. B. Brown and L. Reyes (2012). "Disruption of the S41 peptidase gene in *mycoplasma mycoides* capri impacts proteome profile, H₂O₂ production, and sensitivity to heat shock." PLoS One **7**(12): e51345.
- Ambroset, C., C. Pau-Roblot, Y. Game, P. Gaurivaud and F. Tardy (2017). "Identification and Characterization of *Mycoplasma feriruminatoris* sp. nov. Strains Isolated from Alpine Ibex: A 4th Species in the *Mycoplasma mycoides* Cluster Hosted by Non-domesticated Ruminants?" Front Microbiol **8**: 939.
- Arfi, Y., L. Minder, C. Di Primo, A. Le Roy, C. Ebel, L. Coquet, S. Claverol, S. Vashee, J. Jores, A. Blanchard and P. Sirand-Pugnet (2016). "MIB-MIP is a mycoplasma system that captures and cleaves immunoglobulin G." Proc Natl Acad Sci U S A **113**(19): 5406-5411.
- Arif, A., J. Schulz, F. Thiaucourt, A. Taha and S. Hammer (2007). "Contagious caprine pleuropneumonia outbreak in captive wild ungulates at Al Wabra Wildlife Preservation, State of Qatar." J Zoo Wildl Med **38**(1): 93-96.
- Armengaud, J., J. A. Christie-Oleza, G. Clair, V. Malard and C. Duport (2012). "Exoproteomics: exploring the world around biological systems." Expert Review of Proteomics **9**(5): 561-575.
- Asmare, K., T. Abayneh, S. Mekuria, G. Ayelet, B. Sibhat, E. Skjerve, B. Szonyi and B. Wieland (2016). "A meta-analysis of contagious caprine pleuropneumonia (CCPP) in Ethiopia." Acta Trop **158**: 231-239.

Atim, S. A., C. Ayebazibwe, F. N. Mwiine, J. Erume and R. Tweyongyere (2016). "A Survey for Contagious Caprine Pleuropneumonia in Agago and Otuke Districts in Northern Uganda." Open Journal of Veterinary Medicine **06**(01): 9-14.

Ayling, R. D., S. Bisgaard-Frantzen, J. B. March, K. Godinho and R. A. Nicholas (2005). "Assessing the in vitro effectiveness of antimicrobials against *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small-colony type to reduce contagious bovine pleuropneumonia infection." Antimicrob Agents Chemother **49**(12): 5162-5165.

Ayon-Nunez, D. A., G. Fragoso, R. J. Bobes and J. P. Laclette (2018). "Plasminogen-binding proteins as an evasion mechanism of the host's innate immunity in infectious diseases." Biosci Rep **38**(5).

Balish, M., A. Bertaccini, A. Blanchard, D. Brown, G. Browning, V. Chalker, J. Frey, G. Gasparich, L. Hoelzle, T. Knight, C. Knox, C.-H. Kuo, L. Manso-Silván, M. May, J. D. Pollack, A. S. Ramírez, J. Spersger, D. Taylor-Robinson, D. Volokhov and Y. Zhao (2019). "Recommended rejection of the names *Malacoplasma* gen. nov., *Mesomycoplasma* gen. nov., *Metamycoplasma* gen. nov., *Metamycoplasmataceae* fam. nov., *Mycoplasmoidaceae* fam. nov., *Mycoplasmoidales* ord. nov., *Mycoplasmoides* gen. nov., *Mycoplasmopsis* gen. nov. [Gupta, Sawnani, Adeolu, Alnajjar and Oren 2018] and all proposed species comb. nov. placed therein." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.

Baranowski, E., D. Bergonier, E. Sagne, M. C. Hygonenq, P. Ronsin, X. Berthelot and C. Citti (2014). "Experimental infections with *Mycoplasma agalactiae* identify key factors involved in host-colonization." PLoS One **9**(4): e93970.

Barré, A., A. de Daruvar and A. Blanchard (2004). "MolliGen, a database dedicated to the comparative genomics of Mollicutes." Nucleic acids research **32**(Database issue): D307-D310.

Barthel, D., S. Schindler and P. F. Zipfel (2012). "Plasminogen is a complement inhibitor." J Biol Chem **287**(22): 18831-18842.

Becker, C. A. M., R. Maillard, S. Assié, F. Poumarat, F. Tardy and M. A. Arcangioli (2017). "Les mycoplasmes dans les syndromes respiratoires chez le veau et le jeune bovin adulte." Le nouveau praticien vétérinaire élevages et santé **vol 10 n°38**.

Behrens, A., M. Heller, H. Kirchhoff, D. Yogev and R. Rosengarten (1994). "A family of phase- and size-variant membrane surface lipoprotein antigens (Vsps) of *Mycoplasma bovis*." Infection and immunity **62**(11): 5075-5084.

Bergey's (2010). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. N. R. Krieg, Ludwig, W., Whitman, W., Hedlund, B.P., Paster, B.J., Staley, J.T., Ward, N., Brown, D., Parte, A., Springer-Verlag New York. **4**.

Bergonier, D., X. Berthelot and F. Poumarat (1997). "Contagious agalactia of small ruminants: current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control." Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. **16**: 848-873.

Bertin, C., C. Pau-Roblot, J. Courtois, L. Manso-Silvan, F. Tardy, F. Poumarat, C. Citti, P. Sirand-Pugnet, P. Gaurivaud and F. Thiaucourt (2015). "Highly dynamic genomic loci drive the synthesis of two types of capsular or secreted polysaccharides within the *Mycoplasma mycoides* cluster." Appl Environ Microbiol **81**(2): 676-687.

Bertin, C., C. Pau-Roblot, J. Courtois, L. Manso-Silvan, F. Thiaucourt, F. Tardy, D. Le Grand, F. Poumarat and P. Gaurivaud (2013). "Characterization of free exopolysaccharides secreted by *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*." PLoS One **8**(7): e68373.

Beven, L., C. Charenton, A. Dautant, G. Bouyssou, F. Labroussaa, A. Skollermo, A. Persson, A. Blanchard and P. Sirand-Pugnet (2012). "Specific evolution of F1-like ATPases in mycoplasmas." PLoS One **7**(6): e38793.

Bitto, N. J., R. Chapman, S. Pidot, A. Costin, C. Lo, J. Choi, T. D'Cruze, E. C. Reynolds, S. G. Dashper, L. Turnbull, C. B. Whitchurch, T. P. Stinear, K. J. Stacey and R. L. Ferrero (2017). "Bacterial membrane vesicles transport their DNA cargo into host cells." Sci Rep **7**(1): 7072.

Bladen, H. A. and J. F. Waters (1963). "Electron microscopic study of some strains of bacteroides." Journal of bacteriology **86**(6): 1339-1344.

Blötz, C., C. Lartigue, Y. Valverde Timana, E. Ruiz, B. Paetzold, J. Busse and J. Stülke (2018). "Development of a replicating plasmid based on the native oriC in *Mycoplasma pneumoniae*." Microbiology **164**(11): 1372-1382.

Blotz, C. and J. Stulke (2017). "Glycerol metabolism and its implication in virulence in *Mycoplasma*." FEMS Microbiol Rev **41**(5): 640-652.

Bogema, D. R., A. T. Deutscher, L. K. Woolley, L. M. Seymour, B. B. Raymond, J. L. Tacchi, M. P. Padula, N. E. Dixon, F. C. Minion, C. Jenkins, M. J. Walker and S. P. Djordjevic (2012). "Characterization of cleavage events in the multifunctional cilium adhesin Mhp684 (P146) reveals a mechanism by which *Mycoplasma hyopneumoniae* regulates surface topography." MBio **3**(2).

Bogema, D. R., N. E. Scott, M. P. Padula, J. L. Tacchi, B. B. Raymond, C. Jenkins, S. J. Cordwell, F. C. Minion, M. J. Walker and S. P. Djordjevic (2011). "Sequence TTKF downward arrow QE defines the site of proteolytic cleavage in Mhp683 protein, a novel glycosaminoglycan and cilium adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae*." J Biol Chem **286**(48): 41217-41229.

Bomberger, J. M., D. P. Maceachran, B. A. Coutermarsh, S. Ye, G. A. O'Toole and B. A. Stanton (2009). "Long-distance delivery of bacterial virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicles." PLoS Pathog **5**(4): e1000382.

Bonnefois, T., M. S. Vernerey, V. Rodrigues, P. Totte, C. Puech, C. Ripoll, F. Thiaucourt and L. Manso-Silvan (2016). "Development of fluorescence expression tools to study host-mycoplasma interactions and validation in two distant mycoplasma clades." J Biotechnol **236**: 35-44.

Bordet, J. (1910). "La morphologie du microbe de la péripneumonie des bovidés." Annales de l'institut Pasteur **24**: 161-167.

Bordier, C. (1981). "Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution." Journal of Biological Chemistry **256**: 1604-1607

Breton, M., F. Tardy, E. Dordet-Frisoni, E. Sagne, V. Mick, J. Renaudin, P. Sirand-Pugnet, C. Citti and A. Blanchard (2012). "Distribution and diversity of mycoplasma plasmids: lessons from cryptic genetic elements." BMC Microbiol **12**: 257.

Brocchi, E., D. Gamba, F. Poumarat, J. L. Martel and F. Simone (1993). "Improvements in the diagnosis of contagious pleuropneumonia through the use of monoclonal antibodies." Rev. Sci. Tech. 12:559-570.

Brown, L., A. Kessler, P. Cabezas-Sanchez, J. L. Luque-Garcia and A. Casadevall (2014). "Extracellular vesicles produced by the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* are disrupted by the lipopeptide surfactin." Mol Microbiol 93(1): 183-198.

Brown, L., J. M. Wolf, R. Prados-Rosales and A. Casadevall (2015). "Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi." Nat Rev Microbiol 13(10): 620-630.

Browning, G. F., A. H. Noormohammadi and P. F. Markham (2014). "Identification and characterization of virulence genes in mycoplasmas." p. 77-90. In Browning G, F., Citti C (ed.), Mollicutes, molecular biology and pathogenesis. Caister Academic Press, Norfolk, UK.

Buchenau, I., F. Poumarat, D. Le Grand, H. Linkner, R. Rosengarten and M. Hewicker-Trautwein (2010). "Expression of *Mycoplasma bovis* variable surface membrane proteins in the respiratory tract of calves after experimental infection with a clonal variant of *Mycoplasma bovis* type strain PG45." Res Vet Sci 89(2): 223-229.

Burki, S., V. Gaschen, M. H. Stoffel, A. Stojiljkovic, J. Frey, K. Kuehni-Boghenbor and P. Pilo (2015). "Invasion and persistence of *Mycoplasma bovis* in embryonic calf turbinate cells." Vet Res 46: 53.

Butler, C. J., W. H. Edwards, J. T. Paterson, K. M. Proffitt, J. E. Jennings-Gaines, H. J. Killion, M. E. Wood, J. M. Ramsey, E. S. Almberg, S. R. Dewey, D. E. McWhirter, A. B. Courtemanch, P. J. White, J. J. Rotella and R. A. Garrott (2018). "Respiratory pathogens and their association with population performance in Montana and Wyoming bighorn sheep populations." PLoS One 13(11): e0207780.

Butler, J. A., S. A. Sickles, C. J. Johanns and R. F. Rosenbusch (2000). "Pasteurization of Discard *Mycoplasma* Mastitic Milk Used to Feed Calves: Thermal Effects on Various *Mycoplasma*." Journal of Dairy Science Vol. 83, No. 10, 2000.

Cacciotto, C., T. Cubeddu, M. F. Addis, A. G. Anfossi, V. Tedde, G. Tore, T. Carta, S. Rocca, B. Chessa, M. Pittau and A. Alberti (2016). "Mycoplasma lipoproteins are major determinants of neutrophil extracellular trap formation." Cell Microbiol 18(12): 1751-1762.

Calcutt, M. J., I. Lysnyansky, K. Sachse, L. K. Fox, R. A. J. Nicholas and R. D. Ayling (2018). "Gap analysis of *Mycoplasma bovis* disease, diagnosis and control: An aid to identify future development requirements." Transbound Emerg Dis 65 Suppl 1: 91-109.

Caldas, C., A. Cherqui, A. Pereira and N. Simoes (2002). "Purification and characterization of an extracellular protease from *Xenorhabdus nematophila* involved in insect immunosuppression." Appl Environ Microbiol 68(3): 1297-1304.

Camilli, G., G. Tabouret and J. Quintin (2018). "The Complexity of Fungal beta-Glucan in Health and Disease: Effects on the Mononuclear Phagocyte System." Front Immunol 9: 673.

Cao, S., P. Liu, H. Zhu, H. Gong, J. Yao, Y. Sun, G. Geng, T. Wang, S. Feng, M. Han, J. Zhou and Y. Xu (2015). "Extracellular Acidification Acts as a Key Modulator of Neutrophil Apoptosis and Functions." PloS one 10(9): e0137221-e0137221.

Carmo, A. A. F., B. R. C. Costa, J. P. Vago, L. C. de Oliveira, L. P. Tavares, C. R. C. Nogueira, A. L. C. Ribeiro, C. C. Garcia, A. S. Barbosa, B. S. A. F. Brasil, L. M. Dusse, L. S. Barcelos, C. A. Bonjardim, M. M. Teixeira and L. P. Sousa (2014). "Plasmin Induces In Vivo Monocyte Recruitment through Protease-Activated Receptor-1-, MEK/ERK-, and CCR2-Mediated Signaling." The Journal of Immunology **193**(7): 3654.

Casadevall, A. and L. A. Pirofski (2009). "Virulence factors and their mechanisms of action: the view from a damage-response framework." J Water Health **7 Suppl 1**: S2-S18.

Catrein, I., R. Herrmann, A. Bosserhoff and T. Ruppert (2005). "Experimental proof for a signal peptidase I like activity in *Mycoplasma pneumoniae*, but absence of a gene encoding a conserved bacterial type I SPase." FEBS J **272**(11): 2892-2900.

Chambaud, I., R. Heilig, S. Ferris, V. Barbe, D. Samson, F. Galisson, I. Moszer, K. Dybvig, H. Wróblewski, A. Viari, E. P. Rocha and A. Blanchard (2001). "The complete genome sequence of the murine respiratory pathogen *Mycoplasma pulmonis*." Nucleic acids research **29**(10): 2145-2153.

Chang, J.-T., H.-J. Liu and L. Yu (2011). "*Mycoplasma leachii* sp. nov. in calves, China." Emerging infectious diseases **17**(9): 1772-1773.

Chaves, E. G., S. S. Weber, S. N. Bao, L. A. Pereira, A. M. Bailao, C. L. Borges and C. M. Soares (2015). "Analysis of *Paracoccidioides* secreted proteins reveals fructose 1,6-bisphosphate aldolase as a plasminogen-binding protein." BMC Microbiol **15**: 53.

Chen, H., S. Yu, M. Hu, X. Han, D. Chen, X. Qiu and C. Ding (2012). "Identification of biofilm formation by *Mycoplasma gallisepticum*." Vet Microbiol **161**(1-2): 96-103.

Chen, S., H. Hao, P. Zhao, W. Ji, M. Li, Y. Liu and Y. Chu (2018). "Differential Immunoreactivity to Bovine Convalescent Serum Between *Mycoplasma bovis* Biofilms and Planktonic Cells Revealed by Comparative Immunoproteomic Analysis." Front Microbiol **9**: 379.

Chen, S., H. Hao, P. Zhao, Y. Liu and Y. Chu (2018). "Genome-Wide Analysis of *Mycoplasma bovirhinis* GS01 Reveals Potential Virulence Factors and Phylogenetic Relationships." G3 (Bethesda) **8**(5): 1417-1424.

Chen, S., H. Hao, P. Zhao, F. Thiaucourt, Y. He, P. Gao, H. Guo, W. Ji, Z. Wang, Z. Lu, Y. Chu and Y. Liu (2017). "Genome-Wide Analysis of the First Sequenced *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* Strain M1601." G3 (Bethesda) **7**(9): 2899-2906.

Chen, X., J. Huang, H. Zhu, Y. Guo, F. A. Khan, H. Menghwar, G. Zhao and A. Guo (2018). "P27 (MBOV_RS03440) is a novel fibronectin binding adhesin of *Mycoplasma bovis*." Int J Med Microbiol **308**(7): 848-857.

Chernov, V. M., O. A. Chernova, A. A. Mouzykantov, N. B. Baranova, O. V. Gorshkov, M. V. Trushin, T. N. Nesterova and A. A. Ponomareva (2012). "Extracellular membrane vesicles and phytopathogenicity of *Acholeplasma laidlawii* PG8." ScientificWorldJournal **2012**: 315474.

Chernov, V. M., O. A. Chernova, A. A. Mouzykantov, I. R. Efimova, G. F. Shaymardanova, E. S. Medvedeva and M. V. Trushin (2011). "Extracellular vesicles derived from *Acholeplasma laidlawii* PG8." ScientificWorldJournal **11**: 1120-1130.

Chernov, V. M., A. A. Mouzykantov, N. B. Baranova, E. S. Medvedeva, T. Y. Grygorieva, M. V. Trushin, I. E. Vishnyakov, A. V. Sabantsev, S. N. Borchsenius and O. A. Chernova (2014). "Extracellular membrane vesicles secreted by mycoplasma *Acholeplasma laidlawii* PG8 are enriched in virulence proteins." J Proteomics **110**: 117-128.

Chopra-Dewasthaly, R., M. Baumgartner, E. Gamper, C. Innerebner, M. Zimmermann, F. Schilcher, A. Tichy, P. Winter, W. Jechlinger, R. Rosengarten and J. Spargser (2012). "Role of Vpma phase variation in *Mycoplasma agalactiae* pathogenesis." FEMS Immunol Med Microbiol **66**(3): 307-322.

Chopra-Dewasthaly, R., J. Spargser, M. Zimmermann, C. Citti, W. Jechlinger and R. Rosengarten (2017). "Vpma phase variation is important for survival and persistence of *Mycoplasma agalactiae* in the immunocompetent host." PLoS Pathog **13**(9): e1006656.

Chutkan, H., I. Macdonald, A. Manning and M. J. Kuehn (2013). "Quantitative and qualitative preparations of bacterial outer membrane vesicles." Methods Mol Biol **966**: 259-272.

Ciccarelli, F. D., T. Doerks, C. von Mering, C. J. Creevey, B. Snel and P. Bork (2006). "Toward Automatic Reconstruction of a Highly Resolved Tree of Life." Science **311**(5765): 1283.

Citti, C., E. Dordet-Frisoni, L. X. Nouvel, C. H. Kuo and E. Baranowski (2018). "Horizontal Gene Transfers in Mycoplasmas (Mollicutes)." Curr Issues Mol Biol **29**: 3-22.

Citti, C., L.-X. Nouvel and E. Baranowski (2010). "Phase and antigenic variation in mycoplasmas." Future Microbiology **5**(7): 1073-1085.

Cizelj, I., R. L. Bercic, D. Dusanic, M. Narat, J. Kos, P. Dovc and D. Bencina (2011). "Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae express a cysteine protease CysP, which can cleave chicken IgG into Fab and Fc." Microbiology **157**(Pt 2): 362-372.

Coelho, C., L. Brown, M. Maryam, R. Vij, D. F. Q. Smith, M. C. Burnet, J. E. Kyle, H. M. Heyman, J. Ramirez, R. Prados-Rosales, G. Lauvau, E. S. Nakayasu, N. R. Brady, A. Hamacher-Brady, I. Coppens and A. Casadevall (2019). "Listeria monocytogenes virulence factors, including listeriolysin O, are secreted in biologically active extracellular vesicles." J Biol Chem **294**(4): 1202-1217.

Coelho, C. and A. Casadevall (2019). "Answers to naysayers regarding microbial extracellular vesicles." Biochem Soc Trans **47**(4): 1005-1012.

Coelho, D. F., T. P. Saturnino, F. F. Fernandes, P. G. Mazzola, E. Silveira and E. B. Tambourgi (2016). "Azocasein Substrate for Determination of Proteolytic Activity: Reexamining a Traditional Method Using Bromelain Samples." Biomed Res Int **2016**: 8409183.

Connole, M. D., L. Laws and R. K. Hart (1967). "Mastitis in cattle caused by a mycoplasma sp." Australian Veterinary Journal **43**(5): 157-162.

Cottew GS, Breard. A., DaMassa AJ, Erno H, Leach, RH, Lefevre PC, Rodwell AW, Smith GR (1987). "Taxonomy of the Mycoplasma mycoides cluster." Isr J Med Sci **23**: 632-635.

Craney, A. and F. E. Romesberg (2015). "The inhibition of type I bacterial signal peptidase: Biological consequences and therapeutic potential." Bioorg Med Chem Lett **25**(21): 4761-4766.

Curasson (1936). "Traité de pathologie exotique vétérinaire et comparée. ." Tome II. Maladie microbiennes. Vigot Frères, Paris, 688pp.

Dauros Singorenko, P., V. Chang, A. Whitcombe, D. Simonov, J. Hong, A. Phillips, S. Swift and C. Blenkiron (2017). "Isolation of membrane vesicles from prokaryotes: a technical and biological comparison reveals heterogeneity." J Extracell Vesicles **6**(1): 1324731.

De-Haller (1773). "Mémoire sur la contagion parmi le bétail, mis au jour pour l'instruction du public." Berne: 32 p.

Deatherage, B. L. and B. T. Cookson (2012). "Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life." Infect Immun **80**(6): 1948-1957.

Dedieu, L., E. Chapey and V. Balcer-Rodrigues (2005). "Mycoplasma mycoides ssp. mycoides biotype small colony-secreted components induce apoptotic cell death in bovine leucocytes." Scand J Immunol **62**(6): 528-538.

Dedieu, L., V. Mady and P.-C. Lefevre (1995). "Development of two PCR assays for the identification of mycoplasmas causing contagious agalactia." FEMS Microbiology Letters **129**(2-3): 243-249.

Deutscher, A. T., C. Jenkins, F. C. Minion, L. M. Seymour, M. P. Padula, N. E. Dixon, M. J. Walker and S. P. Djordjevic (2010). "Repeat regions R1 and R2 in the P97 paralogue Mhp271 of Mycoplasma hyopneumoniae bind heparin, fibronectin and porcine cilia." Mol Microbiol **78**(2): 444-458.

Deutscher, A. T., J. L. Tacchi, F. C. Minion, M. P. Padula, B. Crossett, D. R. Bogema, C. Jenkins, T. A. Kuit, M. J. Walker and S. P. Djordjevic (2012). "Mycoplasma hyopneumoniae Surface proteins Mhp385 and Mhp384 bind host cilia and glycosaminoglycans and are endoproteolytically processed by proteases that recognize different cleavage motifs." J Proteome Res **11**(3): 1924-1936.

Di Teodoro, G., G. Marruchella, A. Di Provvido, G. Orsini, G. F. Ronchi, A. R. D'Angelo, N. D'Alterio, F. Sacchini and M. Scacchia (2018). "Respiratory explants as a model to investigate early events of contagious bovine pleuropneumonia infection." Vet Res **49**(1): 5.

Djordjevic, S. P., S. J. Cordwell, M. A. Djordjevic, J. Wilton and F. C. Minion (2004). "Proteolytic processing of the Mycoplasma hyopneumoniae cilium adhesin." Infect Immun **72**(5): 2791-2802.

Djordjevic, S. P., W. A. Forbes, J. Forbes-Faulkner, P. Kuhnert, S. Hum, M. A. Hornitzky, E. M. Vilei and J. Frey (2001). "Genetic diversity among Mycoplasma species bovine group 7: clonal isolates from an outbreak of polyarthritis, mastitis, and abortion in dairy cattle." Electrophoresis **22**, 3551-3561.

Djordjevic, S. P., E. M. Vilei and J. Frey (2003). "Characterization of a chromosomal region of Mycoplasma sp. bovine group 7 strain PG50 encoding a glycerol transport locus (gtsABC)." Microbiology **149**(Pt 1): 195-204.

Dorward, D. W. and C. F. Garon (1990). "DNA Is Packaged within Membrane-Derived Vesicles of Gram-Negative but Not Gram-Positive Bacteria." Applied and environmental microbiology **56**(6): 1960-1962.

Dujardin-Beaumetz, E. (1900). "Le microbe de la péripneumonie et sa culture." Paris.

Dupuy, V., L. Manso-Silvan, V. Barbe, P. Thebault, E. Dordet-Frisoni, C. Citti, F. Poumarat, A. Blanchard, M. Breton, P. Sirand-Pugnet and F. Thiaucourt (2012). "Evolutionary history of contagious bovine pleuropneumonia using next generation sequencing of *Mycoplasma mycoides* Subsp. *mycoides* "Small Colony". PLoS One **7**(10): e46821.

Dupuy, V., A. Verdier, F. Thiaucourt and L. Manso-Silvan (2015). "A large-scale genomic approach affords unprecedented resolution for the molecular epidemiology and evolutionary history of contagious caprine pleuropneumonia." Vet Res **46**: 74.

Edward, D. (1954). "The pleuropneumonia group of organisms: a review, together with some new observations." J Gen Microbiol **10**(1):27-64.

Edward, D. F., E (1967). "Proposal for Mollicutes as name of the class established for the order Mycoplasmales." International journal of systematic bacteriology **17**: 267-268.

Effros, R. M. and F. P. Chinard (1969). "The in vivo pH of the extravascular space of the lung." The Journal of clinical investigation **48**(11): 1983-1996.

Elluri, S., C. Enow, S. Vdovikova, P. K. Rompikuntal, M. Dongre, S. Carlsson, A. Pal, B. E. Uhlin and S. N. Wai (2014). "Outer membrane vesicles mediate transport of biologically active *Vibrio cholerae* cytotoxin (VCC) from *V. cholerae* strains." PLoS One **9**(9): e106731.

Eriksson, A. and M. Norgren (2003). "Cleavage of antigen-bound immunoglobulin G by SpeB contributes to streptococcal persistence in opsonizing blood." Infect Immun **71**(1): 211-217.

Fraser, C. M., J. D. Gocayne, O. White, M. D. Adams, R. A. Clayton, R. D. Fleischmann, C. J. Bult, A. R. Kerlavage, G. Sutton, J. M. Kelley, R. D. Fritchman, J. F. Weidman, K. V. Small, M. Sandusky, J. Fuhrmann, D. Nguyen, T. R. Utterback, D. M. Saudek, C. A. Phillips, J. M. Merrick, J. F. Tomb, B. A. Dougherty, K. F. Bott, P. C. Hu, T. S. Lucier, S. N. Peterson, H. O. Smith, C. A. Hutchison, 3rd and J. C. Venter (1995). "The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*." Science **270**(5235): 397-403.

Freundt, E. A. (1955). "The classification of the pleuropneumonia group of organisms (*Borrelomycetales*)." Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon. **5**: 67-78.

Freundt, E. A. (1972). "Present status of the classification of the order mycoplasmales, class mollicutes."

Gao, X., S. Bao, X. Xing, X. Fu, Y. Zhang, H. Xue, F. Wen and Y. Wei (2018). "Fructose-1,6-bisphosphate aldolase of *Mycoplasma bovis* is a plasminogen-binding adhesin." Microb Pathog **124**: 230-237.

Gaurivaud, P., E. Baranowski, C. Pau-Roblot, E. Sagne, C. Citti and F. Tardy (2016). "Mycoplasma agalactiae Secretion of beta-(1-->6)-Glucan, a Rare Polysaccharide in Prokaryotes, Is Governed by High-Frequency Phase Variation." Appl Environ Microbiol **82**(11): 3370-3383.

Gaurivaud, P., S. Ganter, A. Villard, L. Manso-Silvan, D. Chevret, C. Boule, V. Monnet and F. Tardy (2018). "Mycoplasmas are no exception to extracellular vesicles release: Revisiting old concepts." PLoS One **13**(11): e0208160.

Gaurivaud, P., L. Lakhdar, D. Le Grand, F. Poumarat and F. Tardy (2014). "Comparison of in vivo and in vitro properties of capsulated and noncapsulated variants of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* strain Afade: a potential new insight into the biology of contagious bovine pleuropneumonia." FEMS Microbiol Lett **359**(1): 42-49.

Gaurivaud, P., L. Manso-Silvan, F. Poumarat, P. Hendrikx, F. Thiaucourt and F. Tardy (2017). "Péripleuripneumonie contagieuse bovine et pleuropneumonie contagieuse caprine, situation mondiale, risque et surveillance en France." Le nouveau praticien vétérinaire élevages et santé **Volume 10 n°38**.

Gaurivaud, P., A. Persson, D. L. Grand, J. Westberg, M. Solsona, K. E. Johansson and F. Poumarat (2004). "Variability of a glucose phosphotransferase system permease in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony." Microbiology **150**(Pt 12): 4009-4022.

Gautier-Bouchardon, A. V., S. Ferre, D. Le Grand, A. Paoli, E. Gay and F. Poumarat (2014). "Overall decrease in the susceptibility of *Mycoplasma bovis* to antimicrobials over the past 30 years in France." PLoS One **9**(2): e87672.

Gibson, D. G., J. I. Glass, C. Lartigue, V. N. Noskov, R.-Y. Chuang, M. A. Algire, G. A. Benders, M. G. Montague, L. Ma, M. M. Moodie, C. Merryman, S. Vashee, R. Krishnakumar, N. Assad-Garcia, C. Andrews-Pfannkoch, E. A. Denisova, L. Young, Z.-Q. Qi, T. H. Segall-Shapiro, C. H. Calvey, P. P. Parmar, C. A. Hutchison, H. O. Smith and J. C. Venter (2010). "Creation of a Bacterial Cell Controlled by a Chemically Synthesized Genome." Science **329**(5987): 52.

Glew, M. D., L. Papazisi, F. Poumarat, D. Bergonier, R. Rosengarten and C. Citti (2000). "Characterization of a multigene family undergoing high-frequency DNA rearrangements and coding for abundant variable surface proteins in *Mycoplasma agalactiae*." Infection and immunity **68**(8): 4539-4548.

Goh, M. S., T. S. Gorton, M. H. Forsyth, K. E. Troy and S. J. Geary (1998). "Molecular and biochemical analysis of a 105 kDa *Mycoplasma gallisepticum* cytoadhesin (GapA)." Microbiology **144**(11): 2971-2978.

Gomri, M. A., A. Rico-Diaz, J. J. Escuder-Rodriguez, T. El Moulouk Khaldi, M. I. Gonzalez-Siso and K. Kharroub (2018). "Production and Characterization of an Extracellular Acid Protease from Thermophilic *Brevibacillus* sp. OA30 Isolated from an Algerian Hot Spring." Microorganisms **6**(2).

Gong, M., L. Meng, B. Jiang, J. Zhang, H. Yang, J. Wu and C. Shou (2008). "p37 from *Mycoplasma hyorhinis* promotes cancer cell invasiveness and metastasis through activation of MMP-2 and followed by phosphorylation of EGFR." Molecular Cancer Therapeutics **7**(3): 530.

Graham, J. M. (2002). "Separation of membrane vesicles and cytosol from cultured cells and bacteria in a preformed discontinuous gradient." ScientificWorldJournal **2**: 1555-1559.

Grosshennig, S., T. Ischebeck, J. Gibhardt, J. Busse, I. Feussner and J. Stulke (2016). "Hydrogen sulfide is a novel potential virulence factor of *Mycoplasma pneumoniae*: characterization of the unusual cysteine desulfurase/desulphydrase HapE." Mol Microbiol **100**(1): 42-54.

Grover, R. K., X. Zhu, T. Nieusma, T. Jones, I. Boreo, A. S. MacLeod, A. Mark, S. Niessen, H. J. Kim, L. Kong, N. Assad-Garcia, K. Kwon, M. Chesi, V. V. Smider, D. R. Salomon, D. F. Jelinek, R. A. Kyle, R. B. Pyles, J. I. Glass, A. B. Ward, I. A. Wilson and R. A. Lerner (2014). "A structurally distinct human mycoplasma protein that generically blocks antigen-antibody union." Science **343**(6171): 656-661.

Grundel, A., E. Jacobs and R. Dumke (2016). "Interactions of surface-displayed glycolytic enzymes of *Mycoplasma pneumoniae* with components of the human extracellular matrix." Int J Med Microbiol **306**(8): 675-685.

- Grundel, A., M. Pfeiffer, E. Jacobs and R. Dumke (2015). "Network of Surface-Displayed Glycolytic Enzymes in *Mycoplasma pneumoniae* and Their Interactions with Human Plasminogen." Infect Immun **84**(3): 666-676.
- Guerreiro, E. M., B. Vestad, L. A. Steffensen, H. C. D. Aass, M. Saeed, R. Ovstebo, D. E. Costea, H. K. Galtung and T. M. Soland (2018). "Efficient extracellular vesicle isolation by combining cell media modifications, ultrafiltration, and size-exclusion chromatography." PLoS One **13**(9): e0204276.
- Guerrero-Mandujano, A., C. Hernandez-Cortez, J. A. Ibarra and G. Castro-Escarpulli (2017). "The outer membrane vesicles: Secretion system type zero." Traffic **18**(7): 425-432.
- Guo, Y., H. Zhu, J. Wang, J. Huang, F. A. Khan, J. Zhang, A. Guo and X. Chen (2017). "TrmFO, a Fibronectin-Binding Adhesin of *Mycoplasma bovis*." Int J Mol Sci **18**(8).
- Gupta, R. S., S. Sawnani, M. Adeolu, S. Alnajar and A. Oren (2018). "Phylogenetic framework for the phylum Tenericutes based on genome sequence data: proposal for the creation of a new order Mycoplasmoidales ord. nov., containing two new families Mycoplasmoidaceae fam. nov. and Metamycoplasmataceae fam. nov. harbouring Eperythrozoon, Ureaplasma and five novel genera." Antonie Van Leeuwenhoek **111**(9): 1583-1630.
- Hale, H. H., C. F. Helmboldt, W. N. Plastring and S. E.F. (1961). "Bovine mastitis caused by a mycoplasma species." The Cornell veterinarian. v.52.: P. 582-591.
- Hardy, R. D., J. J. Coalson, J. Peters, A. Chaparro, C. Techasaensiri, A. M. Cantwell, T. R. Kannan, J. B. Baseman and P. H. Dube (2009). "Analysis of pulmonary inflammation and function in the mouse and baboon after exposure to *Mycoplasma pneumoniae* CARDS toxin." PLoS One **4**(10): e7562.
- Harris, L. G., S. J. Foster and R. G. Richards (2002). "An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review." European Cells and Materials **4**: 39-60.
- Hartjes, T. A., S. Mytnyk, G. W. Jenster, V. van Steijn and M. E. van Royen (2019). "Extracellular Vesicle Quantification and Characterization: Common Methods and Emerging Approaches." Bioengineering (Basel) **6**(1).
- Haurat, M. F., W. Elhenawy and M. F. Feldman (2015). "Prokaryotic membrane vesicles: new insights on biogenesis and biological roles." Biol Chem **396**(2): 95-109.
- Hegde, S., J. Sperser, R. Brunthaler, R. Rosengarten and R. Chopra-Dewasthaly (2014). "In vitro and in vivo cell invasion and systemic spreading of *Mycoplasma agalactiae* in the sheep infection model." Int J Med Microbiol **304**(8): 1024-1031.
- Hegde, S., M. Zimmermann, R. Rosengarten and R. Chopra-Dewasthaly (2018). "Novel role of Vpmas as major adhesins of *Mycoplasma agalactiae* mediating differential cell adhesion and invasion of Vpma expression variants." Int J Med Microbiol **308**(2): 263-270.
- Henderson, B. and A. Martin (2011). "Bacterial virulence in the moonlight: multitasking bacterial moonlighting proteins are virulence determinants in infectious disease." Infect Immun **79**(9): 3476-3491.

Himmelreich, R., H. Hilbert, H. Plagens, E. Pirkel, B. C. Li and R. Herrmann (1996). "Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*." Nucleic acids research **24**(22): 4420-4449.

Hopfe, M. and B. Henrich (2008). "OppA, the ecto-ATPase of *Mycoplasma hominis* induces ATP release and cell death in HeLa cells." BMC Microbiol **8**: 55.

Hsu, T. and F. C. Minion (1998). "Molecular analysis of the P97 cilium adhesin operon of *Mycoplasma hyopneumoniae*." Gene **214**(1): 13-23.

Hudson, J., S. Buttery and G. Cottew (1967). "Investigations into the influence of the galactan of *Mycoplasma mycoides* on experimental infection with that organism." Pathol Bacteriol **94**: 257-273.

Hum, S., A. Kessell, S. Djordjevic, R. Rheinberger, M. Hornitzky, W. Forbes and J. Gonsalves (2000). "Mastitis, polyarthritis and abortion caused by *Mycoplasma* species bovine group 7 in dairy cattle." Australian Veterinary Journal **78**(11): 744-750.

Hutcheon, D. (1881). "Contagious pleuro-pneumonia in angora goats." The veterinary journal.

Hutcheon, D. (1889). "Contagious pleuro-pneumonia in goats at cape colony, south africa." The veterinary journal.

Imamura, T., S. Tanase, G. Szmyd, A. Kozik, J. Travis and J. Potempa (2005). "Induction of vascular leakage through release of bradykinin and a novel kinin by cysteine proteinases from *Staphylococcus aureus*." J Exp Med **201**(10): 1669-1676.

Indikova, I., P. Much, L. Stipkovits, K. Siebert-Gulle, M. P. Szostak, R. Rosengarten and C. Citti (2013). "Role of the GapA and CrmA cytoadhesins of *Mycoplasma gallisepticum* in promoting virulence and host colonization." Infect Immun **81**(5): 1618-1624.

Jaffe, J. D., N. Stange-Thomann, C. Smith, D. DeCaprio, S. Fisher, J. Butler, S. Calvo, T. Elkins, M. G. FitzGerald, N. Hafez, C. D. Kodira, J. Major, S. Wang, J. Wilkinson, R. Nicol, C. Nusbaum, B. Birren, H. C. Berg and G. M. Church (2004). "The complete genome and proteome of *Mycoplasma mobile*." Genome research **14**(8): 1447-1461.

Jang, K. S., M. J. Sweredoski, R. L. Graham, S. Hess and W. M. Clemons, Jr. (2014). "Comprehensive proteomic profiling of outer membrane vesicles from *Campylobacter jejuni*." J Proteomics **98**: 90-98.

Jarocki, V. M., J. Santos, J. L. Tacchi, B. B. Raymond, A. T. Deutscher, C. Jenkins, M. P. Padula and S. P. Djordjevic (2015). "MHJ_0461 is a multifunctional leucine aminopeptidase on the surface of *Mycoplasma hyopneumoniae*." Open Biol **5**(1): 140175.

Jiang, F., J. He, N. Navarro-Alvarez, J. Xu, X. Li, P. Li and W. Wu (2016). "Elongation Factor Tu and Heat Shock Protein 70 Are Membrane-Associated Proteins from *Mycoplasma ovipneumoniae* Capable of Inducing Strong Immune Response in Mice." PLoS One **11**(8): e0161170.

Jiang, Y., Q. Kong, K. L. Roland and R. Curtiss, 3rd (2014). "Membrane vesicles of *Clostridium perfringens* type A strains induce innate and adaptive immunity." Int J Med Microbiol **304**(3-4): 431-443.

Johnson, C., T. R. Kannan and J. B. Baseman (2009). "Characterization of a unique ADP-ribosyltransferase of *Mycoplasma penetrans*." Infect Immun **77**(10): 4362-4370.

Jores, J., L. Ma, P. Ssajjakambwe, E. Schieck, A. Liljander, S. Chandran, M. H. Stoffel, V. Cippa, Y. Arfi, N. Assad-Garcia, L. Falquet, P. Sirand-Pugnet, A. Blanchard, C. Lartigue, H. Posthaus, F. Labroussaa and S. Vashee (2019). "Removal of a Subset of Non-essential Genes Fully Attenuates a Highly Virulent *Mycoplasma* Strain." Front Microbiol **10**: 664.

Jores, J. A. Fischer, P. Sirand-Pugnet, A. Thomann, E. M. Liebler-Tenorio, C. Schnee, I. Santana-Cruz, M. heller and J. Frey (2013). "*Mycoplasma feriruminatoris* sp. nov., a fast growing *Mycoplasma* species isolated from wild Caprinae." Systematic and Applied Microbiology **36**(8) : 533-538.

Jores, J., J. Meens, F. F. Buettner, B. Linz, J. Naessens and G. F. Gerlach (2009). "Analysis of the immunoproteome of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type reveals immunogenic homologues to other known virulence traits in related *Mycoplasma* species." Vet Immunol Immunopathol **131**(3-4): 238-245.

Jores, J., E. Schieck, A. Liljander, F. Sacchini, H. Posthaus, C. Lartigue, A. Blanchard, F. Labroussaa and S. Vashee (2018). "In vivo role of capsular polysaccharide in *Mycoplasma mycoides*." The Journal of Infectious Diseases **219**(10): 1559-1563.

Kalra, H., G. P. Drummen and S. Mathivanan (2016). "Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing." Int J Mol Sci **17**(2): 170.

Kannan, T. R. and J. B. Baseman (2006). "ADP-ribosylating and vacuolating cytotoxin of *Mycoplasma pneumoniae* represents unique virulence determinant among bacterial pathogens." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**(17): 6724-6729.

Kannan, T. R., O. Musatovova, S. Balasubramanian, M. Cagle, J. L. Jordan, T. M. Krunkosky, A. Davis, R. D. Hardy and J. B. Baseman (2010). "*Mycoplasma pneumoniae* Community Acquired Respiratory Distress Syndrome toxin expression reveals growth phase and infection-dependent regulation." Mol Microbiol **76**(5): 1127-1141.

Khalil, D., C. A. M. Becker and F. Tardy (2016). "Alterations in the Quinolone Resistance-Determining Regions and Fluoroquinolone Resistance in Clinical Isolates and Laboratory-Derived Mutants of *Mycoplasma bovis*: Not All Genotypes May Be Equal." Appl Environ Microbiol **82**(4): 1060-1068.

Kim, J. H., J. Lee, J. Park and Y. S. Gho (2015). "Gram-negative and Gram-positive bacterial extracellular vesicles." Semin Cell Dev Biol **40**: 97-104.

Kipronoh, K. A., J. N. Ombui, Y. S. Binopal, H. O. Wesonga, E. K. Gitonga, E. Thurairara and H. K. Kiara (2016). "Risk factors associated with contagious caprine pleuro-pneumonia in goats in pastoral areas in the Rift Valley region of Kenya." Prev Vet Med **132**: 107-112.

Klieneberger-Nobel, E. (1960). "L-forms of bacteria." (In I.C. Gunsalus and R.Y. Stanier (ed.), *The Bacteria*, vol. 1. Academic Press, New York, NY.): 361-386.

Klieneberger, E. (1935). "The natural occurrence of pleuropneumonia-like organisms in apparent symbiosis with *Streptobacillus moniliformis* and other bacteria." J. Pathol. Bacteriol. **40**:93-105.

Klimentova, J. and J. Stulik (2015). "Methods of isolation and purification of outer membrane vesicles from gram-negative bacteria." Microbiol Res **170**: 1-9.

Kolar, S. L., J. A. Ibarra, F. E. Rivera, J. M. Mootz, J. E. Davenport, S. M. Stevens, A. R. Horswill and L. N. Shaw (2013). "Extracellular proteases are key mediators of Staphylococcus aureus virulence via the global modulation of virulence-determinant stability." Microbiologyopen **2**(1): 18-34.

Konoshenko, M. Y., E. A. Lekchnov, A. V. Vlassov and P. P. Laktionov (2018). "Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends." Biomed Res Int **2018**: 8545347.

Kornspan, J. D., M. Tarshis and S. Rottem (2011). "Adhesion and biofilm formation of Mycoplasma pneumoniae on an abiotic surface." Arch Microbiol **193**(11): 833-836.

Kottom, T. J., D. M. Hebrink, P. E. Jenson, G. Gudmundsson and A. H. Limper (2015). "Evidence for Proinflammatory beta-1,6 Glucans in the Pneumocystis carinii Cell Wall." Infect Immun **83**(7): 2816-2826.

Krause, D. C. and M. F. Balish (2001). "Structure, function, and assembly of the terminal organelle of Mycoplasma pneumoniae." FEMS Microbiology Letters **198**(1): 1-7.

Krause, D. C. and M. F. Balish (2004). "Cellular engineering in a minimal microbe: structure and assembly of the terminal organelle of Mycoplasma pneumoniae." Mol Microbiol **51**(4): 917-924.

Krause, D. C. and J. B. Baseman (1983). "Inhibition of mycoplasma pneumoniae hemadsorption and adherence to respiratory epithelium by antibodies to a membrane protein." Infection and immunity **39**(3): 1180-1186.

Kuehn, M. J. and N. C. Kesty (2005). "Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction." Genes Dev **19**(22): 2645-2655.

Laarman, A. J., G. Mijnheer, J. M. Mootz, W. J. van Rooijen, M. Ruyken, C. L. Malone, E. C. Heezius, R. Ward, G. Milligan, J. A. van Strijp, C. J. de Haas, A. R. Horswill, K. P. van Kessel and S. H. Rooijackers (2012). "Staphylococcus aureus Staphopain A inhibits CXCR2-dependent neutrophil activation and chemotaxis." EMBO J **31**(17): 3607-3619.

Lartigue, C., Y. Valverde Timana, F. Labroussaa, E. Schieck, A. Liljander, F. Sacchini, H. Posthaus, B. Batailler, P. Sirand-Pugnet, S. Vashee, J. Jores and A. Blanchard (2019). "Attenuation of a Pathogenic Mycoplasma Strain by Modification of the obg Gene by Using Synthetic Biology Approaches." mSphere **4**(3).

Leach, R. H. (1967). "Comparative studies of mycoplasma of bovine origin." Annals of the New York Academy of Sciences **143**(1): 305-316.

Leal Zimmer, F., G. P. Paludo, H. Moura, J. R. Barr and H. B. Ferreira (2019). "Differential secretome profiling of a swine tracheal cell line infected with mycoplasmas of the swine respiratory tract." J Proteomics **192**: 147-159.

Lee, E. Y., D. Y. Choi, D. K. Kim, J. W. Kim, J. O. Park, S. Kim, S. H. Kim, D. M. Desiderio, Y. K. Kim, K. P. Kim and Y. S. Gho (2009). "Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: proteomics-based characterization of Staphylococcus aureus-derived membrane vesicles." Proteomics **9**(24): 5425-5436.

Lee, J. H., C. W. Choi, T. Lee, S. I. Kim, J. C. Lee and J. H. Shin (2013). "Transcription factor sigmaB plays an important role in the production of extracellular membrane-derived vesicles in *Listeria monocytogenes*." PLoS One **8**(8): e73196.

Li, S., G. Xue, H. Zhao, Y. Feng, C. Yan, J. Cui and H. Sun (2019). "The *Mycoplasma pneumoniae* HapE alters the cytokine profile and growth of human bronchial epithelial cells." Biosci Rep **39**(1).

Li, Y., Y. Wang, R. Wang, Y. Zhu, S. Liu, Q. Wang, J. Shao, Y. Chen, L. Gao, C. Zhou, H. Liu, X. Wang, H. Zheng and J. Xin (2016). "Changes in pathogenicity and immunogenicity of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* strains revealed by comparative genomics analysis." Sci Rep **6**: 19081.

Lignereux, L., A.-L. Chaber, C. Saegerman, L. Manso-Silván, A. Peyraud, A. Apolloni and F. Thiaucourt (2018). "Unexpected field observations and transmission dynamics of contagious caprine pleuropneumonia in a sand gazelle herd." Preventive Veterinary Medicine **157**: 70-77.

Liljander, A., F. Sacchini, M. H. Stoffel, E. Schieck, N. Stokar-Regenscheit, F. Labroussaa, M. Heller, J. Salt, J. Frey, L. Falquet, D. Goovaerts and J. Jores (2019). "Reproduction of contagious caprine pleuropneumonia reveals the ability of convalescent sera to reduce hydrogen peroxide production in vitro." Vet Res **50**(1): 10.

Liu, D., Y. Hu, Y. Guo, Z. Zhu, B. Lu, X. Wang and Y. Huang (2017). "Mycoplasma-associated multidrug resistance of hepatocarcinoma cells requires the interaction of P37 and Annexin A2." PLoS One **12**(10): e0184578.

Liu, Q., M. Hu, W. S. Yeo, L. He, T. Li, Y. Zhu, H. Meng, Y. Wang, H. Lee, X. Liu, M. Li and T. Bae (2017). "Rewiring of the FtsH regulatory network by a single nucleotide change in *saeS* of *Staphylococcus aureus*." Sci Rep **7**(1): 8456.

Liu, Y., K. A. Y. Defourny, E. J. Smid and T. Abee (2018). "Gram-Positive Bacterial Extracellular Vesicles and Their Impact on Health and Disease." Front Microbiol **9**: 1502.

Lobb, R. J., M. Becker, S. W. Wen, C. S. Wong, A. P. Wiegmanns, A. Leimgruber and A. Moller (2015). "Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma." J Extracell Vesicles **4**: 27031.

Ludwig, A. K., K. De Miroschedji, T. R. Doeppner, V. Borger, J. Ruesing, V. Rebmann, S. Durst, S. Jansen, M. Bremer, E. Behrmann, B. B. Singer, H. Jastrow, J. D. Kuhlmann, F. El Magraoui, H. E. Meyer, D. M. Hermann, B. Opalka, S. Raunser, M. Eppele, P. A. Horn and B. Giebel (2018). "Precipitation with polyethylene glycol followed by washing and pelleting by ultracentrifugation enriches extracellular vesicles from tissue culture supernatants in small and large scales." J Extracell Vesicles **7**(1): 1528109.

Lysnyansky, I., K. Sachse, R. Rosenbusch, S. Levisohn and D. Yogev (1999). "The *vsp* locus of *Mycoplasma bovis*: gene organization and structural features." Journal of bacteriology **181**(18): 5734-5741.

Ma, T. M., J. S. VanEpps and M. J. Solomon (2017). "Structure, Mechanics, and Instability of Fibrin Clot Infected with *Staphylococcus epidermidis*." Biophys J **113**(9): 2100-2109.

MacOwan, K. J. and J. E. Minette (1976). "A mycoplasma from acute contagious caprine pleuropneumonia in Kenya." Trop Anim Health Prod **8**, 91-95.

Maigre, L., C. Citti, M. Marenda, F. Poumarat and F. Tardy (2008). "Suppression-subtractive hybridization as a strategy to identify taxon-specific sequences within the *Mycoplasma mycoides* Cluster: design and validation of an *M. capricolum* subsp. *capricolum*-specific PCR assay." J Clin Microbiol **46**(4): 1307-1316.

Maniloff, J. and H. J. Morowitz (1972). "Cell biology of the mycoplasmas." Bacteriological reviews **36**(3): 263-290.

Manso-Silván, L., X. Perrier and F. Thiaucourt (2007). "Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster based on analysis of five conserved protein-coding sequences and possible implications for the taxonomy of the group." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **57**(10): 2247-2258.

Manso-Silvan, L., E. M. Vilei, K. Sachse, S. P. Djordjevic, F. Thiaucourt and J. Frey (2009). "*Mycoplasma leachii* sp. nov. as a new species designation for *Mycoplasma* sp. bovine group 7 of Leach, and reclassification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC as a serovar of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*." Int J Syst Evol Microbiol **59**(Pt 6): 1353-1358.

Massimi, I., E. Park, K. Rice, W. Muller-Esterl, D. Sauder and M. J. McGavin (2002). "Identification of a novel maturation mechanism and restricted substrate specificity for the SspB cysteine protease of *Staphylococcus aureus*." J Biol Chem **277**(44): 41770-41777.

McAuliffe, L., R. J. Ellis, K. Miles, R. D. Ayling and R. A. Nicholas (2006). "Biofilm formation by mycoplasma species and its role in environmental persistence and survival." Microbiology **152**(Pt 4): 913-922.

McBroom, A. J. and M. J. Kuehn (2007). "Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response." Molecular microbiology **63**(2): 545-558.

McCaig, W. D., A. Koller and D. G. Thanassi (2013). "Production of outer membrane vesicles and outer membrane tubes by *Francisella novicida*." J Bacteriol **195**(6): 1120-1132.

McGee, Z. A., M. Rogul, S. Falkow and R. G. Witter (1965). "The relationship of *Mycoplasma pneumoniae* (Eaton agent) to *Streptococcus*: application of genetic tests to determine relatedness of L-forms and PPLO to bacteria." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **54**(2): 457-461.

Minion, F. C., E. J. Lefkowitz, M. L. Madsen, B. J. Cleary, S. M. Swartzell and G. G. Mahairas (2004). "The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis." J Bacteriol **186**(21): 7123-7133.

Miyashita, N., H. Akaike, H. Teranishi, K. Ouchi and N. Okimoto (2013). "Macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in adolescents and adults: clinical findings, drug susceptibility, and therapeutic efficacy." Antimicrob Agents Chemother **57**(10): 5181-5185.

Moitinho-Silva, L., B. L. Heineck, L. A. Reolon, J. A. Paes, C. S. Klein, R. Rebelatto, I. S. Schrank, A. Zaha and H. B. Ferreira (2012). "*Mycoplasma hyopneumoniae* type I signal peptidase: expression and evaluation of its diagnostic potential." Vet Microbiol **154**(3-4): 282-291.
MolliGen.

Monnerat¹, M.-P., F. Thiaucourt, J. Nicolet and J. Frey (1999). "Comparative analysis of the lppA locus in *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* and *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*." Veterinary Microbiology **69**(3): 157-172.

Monnerat, M. P., F. Thiaucourt, J. B. Poveda, J. Nicolet and J. Frey (1999). "Genetic and serological analysis of lipoprotein LppA in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC and *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*." Clinical and diagnostic laboratory immunology **6**(2): 224-230.

Monserrat-Martinez, A., Y. Gambin and E. Sierrecki (2019). "Thinking Outside the Bug: Molecular Targets and Strategies to Overcome Antibiotic Resistance." Int J Mol Sci **20**(6).

Muchnik, L., A. Adawi, A. Ohayon, S. Dotan, I. Malka, S. Azriel, M. Shagan, M. Portnoi, D. Kafka, H. Nahmani, A. Porgador, J. M. Gershoni, D. A. Morrison, A. Mitchell, M. Tal, R. Ellis, R. Dagan and Y. M. Nebenzahl (2013). "NADH oxidase functions as an adhesin in *Streptococcus pneumoniae* and elicits a protective immune response in mice." PLoS One **8**(4): e61128.

Mulongo, M., J. Frey, K. Smith, C. Schnier, H. Wesonga, J. Naessens and D. McKeever (2015). "Vaccination of cattle with the N terminus of LppQ of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* results in type III immune complex disease upon experimental infection." Infect Immun **83**(5): 1992-2000.

Mwirigi, M., I. Nkando, M. Olum, S. Attah-Poku, H. Ochanda, E. Berberov, A. Potter, V. Gerdt, J. Perez-Casal, H. Wesonga, R. Soi and J. Naessens (2016). "Capsular polysaccharide from *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* shows potential for protection against contagious bovine pleuropneumonia." Vet Immunol Immunopathol **178**: 64-69.

Natale, P., T. Bruser and A. J. Driessen (2008). "Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane--distinct translocases and mechanisms." Biochim Biophys Acta **1778**(9): 1735-1756.

Neder, V. E., M. Allasia, A. Amadio and L. F. Calvino (2019). "First report of *Mycoplasma leachii* isolation associated with disease in dairy calves in Argentina." Rev Argent Microbiol **51**(1): 18-21.

Neimark, H., K. E. Johansson, Y. Rikihisa and J. G. Tully (2001). "Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of *Candidatus Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus Mycoplasma haemomuris*, *Candidatus Mycoplasma haemosuis*; and *Candidatus Mycoplasma wenyonii*." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **51**(3): 891-899.

Nevermann, J., A. Silva, C. Otero, D. P. Oyarzun, B. Barrera, F. Gil, I. L. Calderon and J. A. Fuentes (2019). "Identification of Genes Involved in Biogenesis of Outer Membrane Vesicles (OMVs) in *Salmonella enterica* Serovar Typhi." Front Microbiol **10**: 104.

Nguyen, N. T. T., F. Rottgerding, G. Devraj, Y. P. Lin, A. Koenigs and P. Kraicz (2018). "The Complement Binding and Inhibitory Protein CbiA of *Borrelia miyamotoi* Degrades Extracellular Matrix Components by Interacting with Plasmin(ogen)." Front Cell Infect Microbiol **8**: 23.

Niang, M., R. F. Rosenbusch, J. J. Andrews and M. L. Kaeberle (1998). "Demonstration of a capsule on *Mycoplasma ovipneumoniae*." American Journal of Veterinary Research **59**: 557-562.

Niang, M., R. F. Rosenbusch, J. Lopez-Virella and M. L. Kaeberle (1997). "Expression of functions by normal sheep alveolar macrophages and their alteration by interaction with *Mycoplasma ovipneumoniae*." Veterinary Microbiology **58**(1): 31-43.

Nicholas, R., R. Ayling and L. McAuliffe (2008). *Mycoplasma Diseases of Ruminants*, CABI.

Nicholas, R. A. J. and R. D. Ayling (2003). "Mycoplasma bovis: disease, diagnosis, and control." Research in Veterinary Science **74**(2): 105-112.

Nocard, Roux, Borrel, Salimbeniet and Dujardin-beaumetz (1898). "Le microbe de la peripneumonie." Annales de l'institut Pasteur **60**: 740-745.

Nogueira, S. V., F. L. Fonseca, M. L. Rodrigues, V. Mundodi, E. A. Abi-Chacra, M. S. Winters, J. F. Alderete and C. M. de Almeida Soares (2010). "Paracoccidioides brasiliensis enolase is a surface protein that binds plasminogen and mediates interaction of yeast forms with host cells." Infect Immun **78**(9): 4040-4050.

Nouvel, L. X., M. Marenda, P. Sirand-Pugnet, E. Sagne, M. Glew, S. Mangenot, V. Barbe, A. Barre, S. Claverol and C. Citti (2009). "Occurrence, plasticity, and evolution of the vpma gene family, a genetic system devoted to high-frequency surface variation in *Mycoplasma agalactiae*." J Bacteriol **191**(13): 4111-4121.

Olaya-Abril, A., R. Prados-Rosales, M. J. McConnell, R. Martin-Pena, J. A. Gonzalez-Reyes, I. Jimenez-Munguia, L. Gomez-Gascon, J. Fernandez, J. L. Luque-Garcia, C. Garcia-Lidon, H. Estevez, J. Pachon, I. Obando, A. Casadevall, L. A. Pirofski and M. J. Rodriguez-Ortega (2014). "Characterization of protective extracellular membrane-derived vesicles produced by *Streptococcus pneumoniae*." J Proteomics **106**: 46-60.

Onodi, Z., C. Pelyhe, C. Terezia Nagy, G. B. Brenner, L. Almasi, A. Kittel, M. Mancek-Keber, P. Ferdinandy, E. I. Buzas and Z. Giricz (2018). "Isolation of High-Purity Extracellular Vesicles by the Combination of Iodixanol Density Gradient Ultracentrifugation and Bind-Elute Chromatography From Blood Plasma." Front Physiol **9**: 1479.

Orench-Rivera, N. and M. J. Kuehn (2016). "Environmentally controlled bacterial vesicle-mediated export." Cell Microbiol **18**(11): 1525-1536.

Ozdemir, U., E. Ozdemir, J. B. March, C. Churchward and R. A. J. Nicholas (2005). "Contagious caprine pleuropneumonia in the Thrace region of Turkey." Veterinary Record **156**(9): 286.

Paes, J. A., K. R. Lorenzatto, S. N. de Moraes, H. Moura, J. R. Barr and H. B. Ferreira (2017). "Secretomes of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* reveal differences associated to pathogenesis." J Proteomics **154**: 69-77.

Pannkuk, E. L., T. S. Risch and B. J. Savary (2015). "Isolation and identification of an extracellular subtilisin-like serine protease secreted by the bat pathogen *Pseudogymnoascus destructans*." PLoS One **10**(3): e0120508.

Papazisi, L., S. Frasca, Jr., M. Gladd, X. Liao, D. Yogev and S. J. Geary (2002). "GapA and CrmA coexpression is essential for *Mycoplasma gallisepticum* cytoadherence and virulence." Infect Immun **70**(12): 6839-6845.

Papazisi, L., T. S. Gorton, G. Kutish, P. F. Markham, G. F. Browning, D. K. Nguyen, S. Swartzell, A. Madan, G. Mahairas and S. J. Geary (2003). "The complete genome sequence of the avian pathogen *Mycoplasma gallisepticum* strain R(low)." Microbiology **149**(Pt 9): 2307-2316.

Papazisi, L., K. E. Troy, T. S. Gorton, X. Liao and S. J. Geary (2000). "Analysis of cytoadherence-deficient, GapA-negative *Mycoplasma gallisepticum* strain R." Infection and immunity **68**(12): 6643-6649.

Párraga-Niño, N., N. Colomé-Calls, F. Canals, E. Querol and M. Ferrer-Navarro (2012). "A Comprehensive Proteome of *Mycoplasma genitalium*." Journal of Proteome Research **11**(6): 3305-3316.

Perez-Casal, J., T. Pryslak, T. Maina, M. Suleman and S. Jimbo (2017). "Status of the development of a vaccine against *Mycoplasma bovis*." Vaccine **35**(22): 2902-2907.

Perreau (1971). "Identification de certaines souches de mycoplasmes de la chèvre à l'espèce *Mycoplasma mycoides* var. *mycoides*." Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop. **24** (3): 343-48.

Persson, A., K. Jacobsson, L. Frykberg, K. E. Johansson and F. Poumarat (2002). "Variable surface protein Vmm of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type." J Bacteriol **184**(13): 3712-3722.

Pettersson, B., T. Leitner, M. Ronaghi, G. Bölske, M. Uhlen and K. E. Johansson (1996). "Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster as determined by sequence analysis of the 16S rRNA genes from the two rRNA operons." Journal of bacteriology **178**(14): 4131-4142.

Peyraud, A., F. Poumarat, F. Tardy, L. Manso-Silvan, K. Hamroev, T. Tilloev, M. Amirbekov, K. Tounkara, C. Bodjo, H. Wesonga, I. G. Nkando, S. Jenberie, M. Yami, E. Cardinale, D. Meenowa, M. R. Jaumally, T. Yaqub, M. Z. Shabbir, N. Mukhtar, M. Halimi, G. M. Ziay, W. Schauwers, H. Noori, A. M. Rajabi, S. Ostrowski and F. Thiaucourt (2014). "An international collaborative study to determine the prevalence of contagious caprine pleuropneumonia by monoclonal antibody-based cELISA." BMC Vet Res **10**: 48.

Peyraud, A., S. Woubit, J. B. Poveda, C. De la Fe, P. Mercier and F. Thiaucourt (2003). "A specific PCR for the detection of *Mycoplasma putrefaciens*, one of the agents of the contagious agalactia syndrome of goats." Molecular and Cellular Probes **17**(6): 289-294.

Pfutzner, H. and K. Sachse (1996). " *Mycoplasma bovis* as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders in cattle." Animal mycoplasmoses and control **15**.

Pierson, T., D. Matrakas, Y. U. Taylor, G. Manyam, V. N. Morozov, W. Zhou and M. L. van Hoek (2011). "Proteomic Characterization and Functional Analysis of Outer Membrane Vesicles of *Francisella novicida* Suggests Possible Role in Virulence and Use as a Vaccine." Journal of Proteome Research **10**(3): 954-967.

Pietrocola, G., G. Nobile, S. Rindi and P. Speziale (2017). "Staphylococcus aureus Manipulates Innate Immunity through Own and Host-Expressed Proteases." Front Cell Infect Microbiol **7**: 166.

Pilo, P., E. M. Vilei, E. Peterhans, L. Bonvin-Klotz, M. H. Stoffel, D. Dobbelaere and J. Frey (2005). "A metabolic enzyme as a primary virulence factor of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony." J Bacteriol **187**(19): 6824-6831.

Pizarro-Cerda, J. and P. Cossart (2006). "Bacterial adhesion and entry into host cells." Cell **124**(4): 715-727.

Potempa, J. and R. N. Pike (2009). "Corruption of innate immunity by bacterial proteases." J Innate Immun **1**(2): 70-87.

Poumarat, F., Jarrige, N., Tardy, F. (2014). "Principe et bilan du réseau Vigimyc consacré à l'épidémiosurveillance des mycoplasmoses des ruminants en France." EuroReference Cahier n°12.

Prada, I. and J. Meldolesi (2016). "Binding and Fusion of Extracellular Vesicles to the Plasma Membrane of Their Cell Targets." Int J Mol Sci **17**(8).

Prados-Rosales, R., A. Baena, L. R. Martinez, J. Luque-Garcia, R. Kalscheuer, U. Veeraraghavan, C. Camara, J. D. Nosanchuk, G. S. Besra, B. Chen, J. Jimenez, A. Glatman-Freedman, W. R. Jacobs, Jr., S. A. Porcelli and A. Casadevall (2011). "Mycobacteria release active membrane vesicles that modulate immune responses in a TLR2-dependent manner in mice." J Clin Invest **121**(4): 1471-1483.

Prados-Rosales, R., L. Brown, A. Casadevall, S. Montalvo-Quiros and J. L. Luque-Garcia (2014). "Isolation and identification of membrane vesicle-associated proteins in Gram-positive bacteria and mycobacteria." MethodsX **1**: 124-129.

Provost, P., Bréard, Le-Goff, Martel, Cottew (1987). "Péripleumonie contagieuse bovine." Revue scientifique et technique - Offie International des Epizooties **6 (3)** : 565-624.

Qi, J., F. Zhang, Y. Wang, T. Liu, L. Tan, S. Wang, M. Tian, T. Li, X. Wang, C. Ding and S. Yu (2018). "Characterization of Mycoplasma gallisepticum pyruvate dehydrogenase alpha and beta subunits and their roles in cytoadherence." PLoS One **13**(12): e0208745.

Ramirez Rico, G., M. Martinez-Castillo, C. Gonzalez-Ruiz, S. Luna-Castro and M. de la Garza (2017). "Mannheimia haemolytica A2 secretes different proteases into the culture medium and in outer membrane vesicles." Microb Pathog **113**: 276-281.

Raymond, B. B. A., C. Jenkins, L. Turnbull, C. B. Whitchurch and S. P. Djordjevic (2018). "Extracellular DNA release from the genome-reduced pathogen Mycoplasma hyopneumoniae is essential for biofilm formation on abiotic surfaces." Sci Rep **8**(1): 10373.

Raymond, B. B. A., L. Turnbull, C. Jenkins, R. Madhkoor, I. Schleicher, C. C. Uphoff, C. B. Whitchurch, M. Rohde and S. P. Djordjevic (2018). "Mycoplasma hyopneumoniae resides intracellularly within porcine epithelial cells." Sci Rep **8**(1): 17697.

Razin, S. (1978). "The mycoplasmas." Microbiological reviews **42**(2): 414-470.

Razin, S. and E. Freundt (1984). "The mycoplasmas." p. 740-793. In Krieg NR, Holt JG (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. I. Williams and Wilkins, Baltimore/London.

Razin, S. and E. Jacobs (1992). "Mycoplasma adhesion." Microbiology **138**(3): 407-422.

Razin, S. and J. G. Tully (1970). "Cholesterol requirement of mycoplasmas." Journal of bacteriology **102**(2): 306-310.

Razin, S., D. Yogev and Y. Naot (1998). "Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas." Microbiology and molecular biology reviews : MMBR **62**(4): 1094-1156.

Reales-Calderon, J. A., F. Corona, L. Monteoliva, C. Gil and J. L. Martinez (2015). "Quantitative proteomics unravels that the post-transcriptional regulator Crc modulates the generation of vesicles and secreted virulence determinants of *Pseudomonas aeruginosa*." J Proteomics **127**(Pt B): 352-364.

Rebollo Couto, M. S., C. S. Klein, D. Voss-Rech and H. Terenzi (2012). "Extracellular Proteins of *Mycoplasma synoviae*." ISRN Vet Sci **2012**: 802308.

Regalla, J., Caporale, V., Giovannini, A., Santini, F., Martel, JL., Goncalves, AP. (1996). "Manifestation and epidemiology of contagious bovine pleuropneumonia in Europe." Rev. Sci.Tech. Int. Off. Epizoot. **15**, 1309-1329.

Reich, P. R., N. L. Somerson, C. J. Hybner, R. M. Chanock and S. M. Weissman (1966). "Genetic differentiation by nucleic Acid homology I. Relationships among *Mycoplasma* species of man." Journal of bacteriology **92**(2): 302-310.

Reolon, L. A., C. L. Martello, I. S. Schrank and H. B. Ferreira (2014). "Survey of surface proteins from the pathogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 7448 using a biotin cell surface labeling approach." PLoS one **9**(11): e112596-e112596.

Rivera, J., R. J. Cordero, A. S. Nakouzi, S. Frases, A. Nicola and A. Casadevall (2010). "Bacillus anthracis produces membrane-derived vesicles containing biologically active toxins." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(44): 19002-19007.

Robertson, J., M. Gomersall and P. Gill (1975). "Mycoplasma hominis: growth, reproduction, and isolation of small viable cells." Journal of bacteriology **124**(2): 1007-1018.

Robinson, M. W., K. A. Buchtmann, C. Jenkins, J. L. Tacchi, B. B. Raymond, J. To, P. Roy Chowdhury, L. K. Woolley, M. Labbate, L. Turnbull, C. B. Whitchurch, M. P. Padula and S. P. Djordjevic (2013). "MHJ_0125 is an M42 glutamyl aminopeptidase that moonlights as a multifunctional adhesin on the surface of *Mycoplasma hyopneumoniae*." Open Biol **3**(4): 130017.

Rodrigues, V., P. Holzmuller, C. Puech, H. Wesonga, F. Thiaucourt and L. Manso-Silvan (2015). "Whole Blood Transcriptome Analysis of *Mycoplasma mycoides* Subsp. *mycoides*-Infected Cattle Confirms Immunosuppression but Does Not Reflect Local Inflammation." PLoS One **10**(10): e0139678.

Rodwell, A. W. and A. Mitchell (1979). 4 - NUTRITION, GROWTH, AND REPRODUCTION. The Mycoplasmas. M. F. Barile and S. Razin, Academic Press: 103-139.

Rogul, M., Z. A. McGee, R. G. Wittler and S. Falkow (1965). "Nucleic acid homologies of selected bacteria, L forms, *Mycoplasma* species." Journal of bacteriology **90**(5): 1200-1204.

Roier, S., F. G. Zingl, F. Cakar, S. Durakovic, P. Kohl, T. O. Eichmann, L. Klug, B. Gadermaier, K. Weinzerl, R. Prassl, A. Lass, G. Daum, J. Reidl, M. F. Feldman and S. Schild (2016). "A novel mechanism for the biogenesis of outer membrane vesicles in Gram-negative bacteria." Nat Commun **7**: 10515.

Rosengarten, R., A. Behrens, A. Stetefeld, M. Heller, M. Ahrens, K. Sachse, D. Yogev and H. Kirchhoff (1994). "Antigen heterogeneity among isolates of *Mycoplasma bovis* is generated by high-frequency variation of diverse membrane surface proteins." Infection and immunity **62**(11): 5066-5074.

Rosengarten, R., C. Citti, M. Glew, A. Lischewski, M. Droeße, P. Much, F. Winner, M. Brank and J. Spargser (2000). "Host-pathogen interactions in mycoplasma pathogenesis: Virulence and survival strategies of minimalist prokaryotes." International Journal of Medical Microbiology **290**(1): 15-25.

Rottem, S. (2003). "Interaction of Mycoplasmas With Host Cells." Physiological Reviews **83**(2): 417-432.
Rurangirwa, F. R., T. C. McGuire, A. Kibor and S. Chema (1987). "An inactivated vaccine for contagious caprine pleuropneumonia." The Veterinary record **121**(17): 397-400.

Sachse, K., J. H. Helbig, I. Lysnyansky, C. Grajetzki, W. Müller, E. Jacobs and D. Yogev (2000). "Epitope mapping of immunogenic and adhesive structures in repetitive domains of Mycoplasma bovis variable surface lipoproteins." Infection and immunity **68**(2): 680-687.

Sato, T., K. Iwabuchi, I. Nagaoka, Y. Adachi, N. Ohno, H. Tamura, K. Seyama, Y. Fukuchi, H. Nakayama, F. Yoshizaki, K. Takamori and H. Ogawa (2006). "Induction of human neutrophil chemotaxis by Candida albicans-derived beta-1,6-long glycoside side-chain-branched beta-glucan." J Leukoc Biol **80**(1): 204-211.

Schrempf, H., I. Koebsch, S. Walter, H. Engelhardt and H. Meschke (2011). "Extracellular Streptomyces vesicles: amphorae for survival and defence." Microb Biotechnol **4**(2): 286-299.

Schumacher, M., P. Nicholson, M. H. Stoffel, S. Chandran, A. D'Mello, L. Ma, S. Vashee, J. Jores and F. Labrousseau (2019). "Evidence for the Cytoplasmic Localization of the L- α -Glycerophosphate Oxidase in Members of the "Mycoplasma mycoides Cluster". " Frontiers in microbiology **10**: 1344-1344.

Schwechheimer, C. and M. J. Kuehn (2015). "Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions." Nat Rev Microbiol **13**(10): 605-619.

Secades, P. and J. A. Guijarro (1999). "Purification and characterization of an extracellular protease from the fish pathogen Yersinia ruckeri and effect of culture conditions on production." Applied and environmental microbiology **65**(9): 3969-3975.

Seto, S., G. Layh-Schmitt, T. Kenri and M. Miyata (2001). "Visualization of the attachment organelle and cytoadherence proteins of Mycoplasma pneumoniae by immunofluorescence microscopy." J Bacteriol **183**(5): 1621-1630.

Seto, S. and M. Miyata (1998). "Cell reproduction and morphological changes in Mycoplasma capricolum." Journal of bacteriology **180**(2): 256-264.

Seymour, L. M., A. T. Deutscher, C. Jenkins, T. A. Kuit, L. Falconer, F. C. Minion, B. Crossett, M. Padula, N. E. Dixon, S. P. Djordjevic and M. J. Walker (2010). "A processed multidomain mycoplasma hyopneumoniae adhesin binds fibronectin, plasminogen, and swine respiratory cilia." J Biol Chem **285**(44): 33971-33978.

Seymour, L. M., C. Jenkins, A. T. Deutscher, B. B. Raymond, M. P. Padula, J. L. Tacchi, D. R. Bogema, G. J. Eamens, L. K. Woolley, N. E. Dixon, M. J. Walker and S. P. Djordjevic (2012). "Mhp182 (P102) binds fibronectin and contributes to the recruitment of plasmin(ogen) to the Mycoplasma hyopneumoniae cell surface." Cell Microbiol **14**(1): 81-94.

Sharma, P., S. Ludwig, L. Muller, C. S. Hong, J. M. Kirkwood, S. Ferrone and T. L. Whiteside (2018). "Immunoaffinity-based isolation of melanoma cell-derived exosomes from plasma of patients with melanoma." Journal of extracellular vesicles **7**(1): 1435138-1435138.

Shimizu, T., Y. Kida and K. Kuwano (2005). "A dipalmitoylated lipoprotein from *Mycoplasma pneumoniae* activates NF-kappa B through TLR1, TLR2, and TLR6." J Immunol **175**(7): 4641-4646.

Silva, M. F., C. M. Mota, V. d. S. Miranda, A. d. O. Cunha, M. C. Silva, K. S. C. Naves, F. de Oliveira, D. A. d. O. Silva, T. W. P. Mineo and F. M. Santiago (2015). "Biological and Enzymatic Characterization of Proteases from Crude Venom of the Ant *Odontomachus bauri*." Toxins **7**(12): 5114-5128.

Simmons, G. C. and L. A. Y. Johnston (1963). "Arthritis in calves caused by mycoplasma sp." Australian Veterinary Journal **39**(1): 11-14.

Simmons, W. L., J. M. Daubenspeck, J. D. Osborne, M. F. Balish, K. B. Waites and K. Dybvig (2013). "Type 1 and type 2 strains of *Mycoplasma pneumoniae* form different biofilms." Microbiology **159**(Pt 4): 737-747.

Simmons, W. L. and K. Dybvig (2007). "Biofilms protect *Mycoplasma pulmonis* cells from lytic effects of complement and gramicidin." Infect Immun **75**(8): 3696-3699.

Singh, S., S. K. Singh, I. Chowdhury and R. Singh (2017). "Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents." The open microbiology journal **11**: 53-62.

Sirand-Pugnet, P., C. Lartigue, M. Marendia, D. Jacob, A. Barré, V. Barbe, C. Schenowitz, S. Mangenot, A. Couloux, B. Segurens, A. de Daruvar, A. Blanchard and C. Citti (2007). "Being pathogenic, plastic, and sexual while living with a nearly minimal bacterial genome." PLoS genetics **3**(5): e75-e75.

Smagur, J., K. Guzik, M. Bzowska, M. Kuzak, M. Zarebski, T. Kantyka, M. Walski, B. Gajkowska and J. Potempa (2009). Staphylococcal cysteine protease staphopain B (SspB) induces rapid engulfment of human neutrophils and monocytes by macrophages. Biological Chemistry. **390**: 361.

Smith, G. R. and J. C. Oliphant (1982). "Some in-vitro characters of the subspecies of *Mycoplasma mycoides*." The Journal of hygiene **89**(3): 521-527.

Soehnlén, M. K., A. Aydin, E. J. Lengerich, B. A. Houser, G. D. Fenton, H. R. Lysczek, C. M. Burns, L. I. Byler, A. L. Hattel, D. R. Wolfgang and B. M. Jayarao (2011). "Blinded, controlled field trial of two commercially available *Mycoplasma bovis* bacterin vaccines in veal calves." Vaccine **29**(33): 5347-5354.

Song, Z., Y. Li, Y. Liu, J. Xin, X. Zou and W. Sun (2012). "alpha-enolase, an adhesion-related factor of *Mycoplasma bovis*." PLoS One **7**(6): e38836.

Syrovets, T., O. Lunov and T. Simmet (2012). "Plasmin as a proinflammatory cell activator." Journal of Leukocyte Biology **92**(3): 509-519.

Szatanek, R., M. Baj-Krzyworzeka, J. Zimoch, M. Lekka, M. Siedlar and J. Baran (2017). "The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization." Int J Mol Sci **18**(6).

Szczepanek, S. M., M. Boccaccio, K. Pflaum, X. Liao and S. J. Geary (2014). "Hydrogen peroxide production from glycerol metabolism is dispensable for virulence of *Mycoplasma gallisepticum* in the tracheas of chickens." Infect Immun **82**(12): 4915-4920.

Tacchi, J. L., B. B. Raymond, V. M. Jarocki, I. J. Berry, M. P. Padula and S. P. Djordjevic (2014). "Cilium adhesin P216 (MHJ_0493) is a target of ectodomain shedding and aminopeptidase activity on the surface of *Mycoplasma hyopneumoniae*." J Proteome Res **13**(6): 2920-2930.

Takov, K., D. M. Yellon and S. M. Davidson (2019). "Comparison of small extracellular vesicles isolated from plasma by ultracentrifugation or size-exclusion chromatography: yield, purity and functional potential." J Extracell Vesicles **8**(1): 1560809.

Tardy, F., E. Baranowski, L. X. Nouvel, V. Mick, L. Manso-Silvan, F. Thiaucourt, P. Thebault, M. Breton, P. Sirand-Pugnet, A. Blanchard, A. Garnier, P. Gibert, Y. Game, F. Poumarat and C. Citti (2012). "Emergence of atypical *Mycoplasma agalactiae* strains harboring a new prophage and associated with an alpine wild ungulate mortality episode." Appl Environ Microbiol **78**(13): 4659-4668.

Tardy, F., P. Gaurivaud, A. Tricot, L. Maigre and F. Poumarat (2009). "Epidemiological surveillance of mycoplasmas belonging to the '*Mycoplasma mycoides*' cluster: is DGGE fingerprinting of 16S rRNA genes suitable?" Lett Appl Microbiol **48**(2): 210-217.

Tardy, F., L. Maigre, A. Tricot, F. Poumarat, L. Nguyen and D. Le Grand (2011). "Comparison of isolates of *Mycoplasma mycoides* subspecies capri from asymptomatic and septicaemic goats." J Comp Pathol **144**(1): 70-77.

Tartaglia, N. R., K. Breyne, E. Meyer, C. Cauty, J. Jardin, D. Chretien, A. Dupont, K. Demeyere, N. Berkova, V. Azevedo, E. Guedon and Y. Le Loir (2018). "Staphylococcus aureus Extracellular Vesicles Elicit an Immunostimulatory Response in vivo on the Murine Mammary Gland." Front Cell Infect Microbiol **8**: 277.

Teshome, D., T. Sori, F. Sacchini and B. Wieland (2019). "Epidemiological investigations of contagious caprine pleuropneumonia in selected districts of Borana zone, Southern Oromia, Ethiopia." Tropical animal health and production **51**(3): 703-711.

Thiaucourt, F. (2003). "Pleuropneumonie contagieuse caprine." Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail - Europe et régions chaudes Vol. 2 chapitre 64.

Thiaucourt, F. and G. Bolske (1996). "Contagious caprine pleuropneumonia and other pulmonary mycoplasmoses of sheep and goats." Animal mycoplasmoses and control **1397-1414**.

Thiaucourt, F., G. Bölske, G. Libeau, C. Le Goff and P. C. Lefèvre (1994). "The use of monoclonal antibodies in the diagnosis of contagious caprine pleuropneumonia (CCPP)." Veterinary Microbiology **41**(3): 191-203.

Thiaucourt, F., O. Pible, G. Miotello, N. Nwankpa and J. Armengaud (2018). "Improving Quality Control of Contagious Caprine Pleuropneumonia Vaccine with Tandem Mass Spectrometry." Proteomics **18**(17): 1800088.

Thomas (1873). "Rapport médical, la maladie des chèvres désignée par les arabes sous le nom de bou-frida qui a sévi épizootiquement pendant l'hiver 1872-73 dans le cerle de Djelfa."

Totte, P., A. Mather, L. Reslan, Y. Boublik, M. Niang, D. Du Plessis and L. Dedieu (2010). "Identification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony genes coding for T-cell antigens." Clin Vaccine Immunol **17**(8): 1211-1216.

Totte, P., C. Puech, V. Rodrigues, C. Bertin, L. Manso-Silvan and F. Thiaucourt (2015). "Free exopolysaccharide from *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* possesses anti-inflammatory properties." Vet Res **46**: 122.

Toyofuku, M., N. Nomura and L. Eberl (2019). "Types and origins of bacterial membrane vesicles." Nat Rev Microbiol **17**(1): 13-24.

Turnbull, L., M. Toyofuku, A. L. Hynen, M. Kurosawa, G. Pessi, N. K. Petty, S. R. Osvath, G. Carcamo-Oyarce, E. S. Gloag, R. Shimoni, U. Omasits, S. Ito, X. Yap, L. G. Monahan, R. Cavaliere, C. H. Ahrens, I. G. Charles, N. Nomura, L. Eberl and C. B. Whitchurch (2016). "Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicles and biofilms." Nat Commun **7**: 11220.

Uilenberg, G., F. Thiaucourt and F. Jongejan (2006). "Mycoplasma and Eperythrozoon (Mycoplasmataceae). Comments on a recent paper." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **56**(1): 13-14.

Urbonavicius, J., S. Skouloubris, H. Myllykallio and H. Grosjean (2005). "Identification of a novel gene encoding a flavin-dependent tRNA:m5U methyltransferase in bacteria--evolutionary implications." Nucleic acids research **33**(13): 3955-3964.

van der Woude, M. W. and A. J. Baumler (2004). "Phase and antigenic variation in bacteria." Clin Microbiol Rev **17**(3): 581-611.

Verkman, A. S., Y. Song and J. R. Thiagarajah (2003). "Role of airway surface liquid and submucosal glands in cystic fibrosis lung disease." American Journal of Physiology-Cell Physiology **284**(1): C2-C15.

Vigimyc (2013). "Rapport annuel du réseau d'épidémio-surveillance des mycoplasmoses des ruminants." F. Poumarat, N. Jarrige and F. Tardy

Vigimyc (2017). Rapport annuel du réseau d'épidémio-surveillance des mycoplasmoses des ruminants. F. Poumarat, M. Jäy, N. Jarrige and F. Tardy

Vijayaraghavan, P. and V. SGP. (2013). "A simple method for the detection of protease activity on agar plates using bromocresolgreen dye." J Biochem Tech **4**(3): **628-630**

Vilei, E. M. and J. Frey (2001). "Genetic and biochemical characterization of glycerol uptake in *mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC: its impact on H₂O₂ production and virulence." Clin Diagn Lab Immunol **8**(1): 85-92.

Voros, A., J. DeLongchamp and M. T. Saleh (2015). "The Secretome of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* in Neutral and Acidic Media." J Proteomics Bioinform **8**: 155-163.

Voros, A., A. Dunnett, L. G. Leduc and M. T. Saleh (2009). "Depleting proteins from the growth medium of *Mycoplasma capricolum* unmasks bacterium-derived enzymatic activities." Vet Microbiol **138**(3-4): 384-389.

Wagner, T., B. Joshi, J. Janice, F. Askarian, N. Skalko-Basnet, O. C. Hagestad, A. Mekhlif, S. N. Wai, K. Hegstad and M. Johannessen (2018). "Enterococcus faecium produces membrane vesicles containing virulence factors and antimicrobial resistance related proteins." J Proteomics **187**: 28-38.

Waite, E. R. and J. B. March (2001). "Effect of HEPES buffer systems upon the pH, growth and survival of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony (MmmSC) vaccine cultures." FEMS Microbiology Letters **201**(2): 291-294.

Waites, K. B. and D. F. Talkington (2004). "Mycoplasma pneumoniae and its role as a human pathogen." Clinical microbiology reviews **17**(4): 697-728.

Walz, P. H., T. P. Mullaney, J. A. Render, R. D. Walker, T. Mosser and J. C. Baker (1997). "Otitis Media in Preweaned Holstein Dairy Calves in Michigan Due to *Mycoplasma Bovis*." Journal of Veterinary Diagnostic Investigation **9**(3): 250-254.

Wang, X., C. D. Thompson, C. Weidenmaier and J. C. Lee (2018). "Release of *Staphylococcus aureus* extracellular vesicles and their application as a vaccine platform." Nat Commun **9**(1): 1379.

Weisburg, W. G., J. G. Tully, D. L. Rose, J. P. Petzel, H. Oyaizu, D. Yang, L. Mandelco, J. Sechrest, T. G. Lawrence and J. Van Etten (1989). "A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification." Journal of bacteriology **171**(12): 6455-6467.

Wessel, D. and U. I. Flügge (1984). "A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids." Analytical Biochemistry **138**(1): 141-143.

Westberg, J., A. Persson, A. Holmberg, A. Goesmann, J. Lundeberg, K.-E. Johansson, B. Pettersson and M. Uhlen (2004). "The genome sequence of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC type strain PG1T, the causative agent of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP)." Genome research **14**(2): 221-227.

Whiteley, L., T. Meffert, M. Haug, C. Weidenmaier, V. Hopf, K. Bitschar, B. Schitteck, C. Kohler, I. Steinmetz, T. E. West and S. Schwarz (2017). "Entry, Intracellular Survival, and Multinucleated-Giant-Cell-Forming Activity of *Burkholderia pseudomallei* in Human Primary Phagocytic and Nonphagocytic Cells." Infection and immunity **85**(10): e00468-00417.

Widjaja, M., K. L. Harvey, L. Hagemann, I. J. Berry, V. M. Jarocki, B. B. A. Raymond, J. L. Tacchi, A. Grundel, J. R. Steele, M. P. Padula, I. G. Charles, R. Dumke and S. P. Djordjevic (2017). "Elongation factor Tu is a multifunctional and processed moonlighting protein." Sci Rep **7**(1): 11227.

Wilton, J., C. Jenkins, S. J. Cordwell, L. Falconer, F. C. Minion, D. C. Oneal, M. A. Djordjevic, A. Connolly, I. Barchia, M. J. Walker and S. P. Djordjevic (2009). "Mhp493 (P216) is a proteolytically processed, cilium and heparin binding protein of *Mycoplasma hyopneumoniae*." Mol Microbiol **71**(3): 566-582.

Woese, C. R. (1987). "Bacterial evolution." Microbiological reviews **51**(2): 221-271.

Woubit, S., S. Lorenzon, A. Peyraud, L. Manso-Silvan and F. Thiaucourt (2004). "A specific PCR for the identification of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*, the causative agent of contagious caprine pleuropneumonia (CCPP)." Vet Microbiol **104**(1-2): 125-132.

Woubit, S., L. Manso-Silvan, S. Lorenzon, P. Gaurivaud, F. Poumarat, M. P. Pellet, V. P. Singh and F. Thiaucourt (2007). "A PCR for the detection of mycoplasmas belonging to the *Mycoplasma mycoides* cluster: application to the diagnosis of contagious agalactia." Mol Cell Probes **21**(5-6): 391-399.

Yamamoto, F., A. Muto, Y. Kawauchi, M. Iwami, S. Iwagami, Y. Azumi and S. Osawa (1985). "UGA is read as tryptophan in *Mycoplasma capricolum*." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **82**(8): 2306-2309.

Yu, Y., H. Wang, J. Wang, Z. Feng, M. Wu, B. Liu, J. Xin, Q. Xiong, M. Liu and G. Shao (2018). "Elongation Factor Thermo Unstable (EF-Tu) Moonlights as an Adhesin on the Surface of *Mycoplasma hyopneumoniae* by Binding to Fibronectin." Frontiers in microbiology **9**: 974-974.

Yus, E., T. Maier, K. Michalodimitrakis, V. van Noort, T. Yamada, W.-H. Chen, J. A. H. Wodke, M. Güell, S. Martínez, R. Bourgeois, S. Kühner, E. Raineri, I. Letunic, O. V. Kalina, M. Rode, R. Herrmann, R. Gutiérrez-Gallego, R. B. Russell, A.-C. Gavin, P. Bork and L. Serrano (2009). "Impact of Genome Reduction on Bacterial Metabolism and Its Regulation." Science **326**(5957): 1263.

Zella, D., S. Curreli, F. Benedetti, S. Krishnan, F. Cocchi, O. S. Latinovic, F. Denaro, F. Romerio, M. Djavani, M. E. Charurat, J. L. Bryant, H. Tettelin and R. C. Gallo (2018). "Mycoplasma promotes malignant transformation in vivo, and its DnaK, a bacterial chaperone protein, has broad oncogenic properties." Proc Natl Acad Sci U S A **115**(51): E12005-E12014.

Zhang, H., G. Zhao, Y. Guo, H. Menghwar, Y. Chen, H. Chen and A. Guo (2016). "Mycoplasma bovis MBOV_RS02825 Encodes a Secretory Nuclease Associated with Cytotoxicity." Int J Mol Sci **17**(5).

Zhang, Q., T. F. Young and R. F. Ross (1994). "Microtiter plate adherence assay and receptor analogs for *Mycoplasma hyopneumoniae*." Infection and immunity **62**(5): 1616-1622.

Zhang, Q., T. F. Young and R. F. Ross (1995). "Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin." Infection and immunity **63**(3): 1013-1019.

Zhao, G., H. Zhang, X. Chen, X. Zhu, Y. Guo, C. He, F. Anwar Khan, Y. Chen, C. Hu, H. Chen and A. Guo (2017). "Mycoplasma bovis NADH oxidase functions as both a NADH oxidizing and O₂ reducing enzyme and an adhesin." Sci Rep **7**(1): 44.

Zheng, C., S. Ren, J. Xu, X. Zhao, G. Shi, J. Wu, J. Li, H. Chen and W. Bei (2017). "Contribution of NADH oxidase to oxidative stress tolerance and virulence of *Streptococcus suis* serotype 2." Virulence **8**(1): 53-65.

Zhou, Y., Y. Wang, Y. Li, N. Nick, X. Zou, F. Bai, J. Wu and J. Xin (2016). "P19 contributes to *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* adhesion to EBL cells." Microb Pathog **93**: 13-21.

Zielinski, G., T. Young, R. Ross and R. Rosenbusch (1990). "Adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to cell monolayers." Am J Vet Res **51**(3):339–343.

Zimmermann, P., V. C. Ziesenitz, N. Curtis and N. Ritz (2018). "The Immunomodulatory Effects of Macrolides-A Systematic Review of the Underlying Mechanisms." Frontiers in immunology **9**: 302-302.

Résumé : Les bactéries du genre *Mycoplasma* (*M.*) sont responsables chez les ruminants de maladies majeures dont trois sont à déclaration obligatoire auprès de l'organisation mondiale de la santé animale. Malgré l'importance de ces bactéries, leurs facteurs de virulence restent mal caractérisés. Les molécules appartenant au sécrétome mycoplasmaïque sont des candidats privilégiés en tant que facteurs de virulence en raison de leur interaction potentielle avec les cellules de l'hôte. Le sécrétome regroupe les composés libérés dans le milieu extracellulaire, l'exosécrétome, et ceux présents à la surface membranaire, ainsi que la machinerie impliquée dans la sécrétion. Il a peu été étudié chez les mycoplasmes. Nos recherches se sont focalisées sur l'exosécrétome et, plus particulièrement, sur les protéases sécrétées et les vésicules extracellulaires pour des espèces de mycoplasmes couramment isolées chez les ruminants, notamment au niveau de la sphère respiratoire.

Une activité protéasique de type caséinolytique a été mise en évidence chez plusieurs espèces. Pour certaines, cette activité pourrait être extracellulaire car détectée dans le surnageant de culture ou diffuse en milieu gélosé. L'emploi d'un milieu défini, couplé à la zymographie et à la spectrométrie de masse, nous a permis d'observer que trois sous-espèces appartenant au « groupe mycoïdes » et pathogènes sécrètent des protéases actives. L'étude d'un mutant de *M. capricolum* subsp. *capricolum*, California Kid dont le gène MCAP_0240 codant pour une protéase S41 a été inactivé, a confirmé que l'activité caséinolytique était portée par cette protéase. De plus, chez ce mutant la sécrétion dans le milieu extérieur de 17 protéines a été modifiée. Cette peptidase pourrait donc intervenir dans le clivage post traductionnel de protéines de surface et donc intervenir dans les mécanismes de sécrétion.

Dans un second temps nous nous sommes intéressés à un autre élément de l'exosécrétome, les vésicules extracellulaires, produites par plusieurs espèces de mycoplasmes en condition de stress nutritionnel. L'étude du protéome membranaire des vésicules nous a permis de mettre en évidence de nombreuses protéines dont la capacité d'interaction avec l'hôte est décrite dans la littérature. Sur une sous-espèce modèle produisant de nombreuses vésicules, *M. mycoides* subsp. *mycoides*, nous avons montré que cette production résultait d'un phénomène actif nécessitant une viabilité cellulaire et avons observé par microscopie électronique la formation de vésicules par bourgeonnement. Dans nos conditions expérimentales, les vésicules extracellulaires sont produites en phase de déclin. Nous nous sommes donc intéressés plus particulièrement à cette phase et à ce qui pourrait favoriser la production de vésicules. Plusieurs conditions expérimentales visant à optimiser la purification des vésicules ont également été testées, l'objectif final étant de pouvoir soumettre les vésicules extracellulaires à une analyse par spectrométrie de masse et ainsi caractériser l'ensemble des protéines présentes.

En conclusion, ces travaux ont permis de détecter dans le milieu extracellulaire de cultures mycoplasmaïques des protéases actives et des vésicules extracellulaires portant à leur membrane diverses protéines en interaction potentielle avec l'hôte animal. Le rôle de ces deux éléments comme systèmes de sécrétion et/ou facteurs de virulence potentiels devra faire l'objet de futures investigations.

Mots clés : Mycoplasmes / Sécrétome / Protéase / Vésicules

Abstract: Bacteria belonging to the *Mycoplasma* (*M.*) genus are responsible for major diseases in ruminants, three of which are notifiable to the world organization for animal health. Despite this, their virulence factors are still poorly characterized. Molecules belonging to the mycoplasma secretome are potential candidates as virulence factors, as they are likely to interact with the host cells. The secretome includes compounds released in the extracellular compartment, also called the exosecretome, compounds exposed to the surface and the secretion machinery itself. The secretome has been poorly studied in mycoplasmas so far. Our research focused on the exosecretome and more specifically on secreted proteases and extracellular vesicles from *Mycoplasma* species commonly isolated in ruminant respiratory tract.

A proteasic, caseinolytic activity was identified for several *Mycoplasma* species. For some of them, this activity was hypothesized to be present in the extracellular compartment as it was detected in the culture supernatant or after diffusion on milk agar plate. The use of a defined medium linked with mass spectrometry allowed us to observe that three pathogenic sub-species belonging to the Mycoïdes cluster were able to secrete active extracellular proteases. A mutant strain of *M. capricolum* subsp. *capricolum* California Kid for which the gene MCAP_0240 (encoding an S41 protease) was inactivated was used to confirm that the extracellular caseinolytic activity was abolished in the absence of the S41 protease. In the mutant strain, the secretion of 17 other proteins was also shown to be modified. Hence, the S41 protease could play a role in post translational cleavage of surface proteins and, thus in secretion mechanisms.

In a second phase, we studied another element of the exosecretome, the extracellular vesicles, which are produced by several *Mycoplasma* species in nutritional stress conditions. Analyses of membrane proteins of the vesicles highlighted several proteins known to be in interaction with the host cells, as described in the literature. *M. mycoides* subsp. *mycoides*, was subsequently chosen as a model sub-species due to its high production of vesicles. It was used to show that vesicles release relies on cell viability and that vesicles are formed by a budding-type mechanisms as observed by electronic microscopy. In our experimental conditions, the vesicles were released in the decline growth phase. In consequence, we tried to identify which conditions of this growth phase were promoting the vesicles production. Several assays for optimizing vesicles purification were also tested in vitro, the ultimate goal being to be able to better characterize the whole extracellular vesicle proteins content by mass spectrometry.

In conclusion, this work allowed us to detect secreted proteases and extracellular vesicles, carrying several membrane proteins, which could interact with the animal host. The role of these two elements as secretion systems and/or virulence factors has yet to be further studied.

Keywords : Mycoplasma / Secretome / Protease / Vesicles